

Universidade de Lisboa
Faculdade de Ciências
Departamento de Biologia Vegetal



Estudo das formas alélicas do gene *FMR1* no Síndrome do X- Frágil e na Menopausa precoce

Susana Isabel Canas Ferreira
Mestrado em Biologia Molecular Humana

2009

Universidade de Lisboa
Faculdade de Ciências
Departamento de Biologia Vegetal



Estudo das formas alélicas do gene *FMR1* no Síndrome do X- Frágil e na Menopausa precoce

Dissertação Orientada pelos Professores Doutores:

Manuel do Carmo Gomes, Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa

Isabel Maria Marques Carreira, Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra

Susana Isabel Canas Ferreira

Mestrado em Biologia Molecular Humana

2009

Agradecimentos

O último ano (lectivo) foi recheado de emoções e sentimentos contraditórios. Por um lado a angústia, o desespero, a incerteza mediante a ausência de resultados ou resultados inesperados. Por outro a alegria, a felicidade, a emoção e também o orgulho de ter conseguido, de não ter desistido e seguido em frente. Os maus momentos foram duros, principalmente quando havia semanas, várias, em que tudo parecia correr mal: reacções de PCR sem resultado, sequenciadores avariados, encomendas que tardavam em chegar e quando chegavam os reagentes não eram os encomendados! Mas foram estes maus momentos que me permitiram viver de forma mais intensa e com mais valor os bons momentos, dando assim valor ao alcançar das metas propostas.

Foi um ano enriquecedor, principalmente a nível científico, mas também a nível pessoal e social, um ano de mudança, de adaptação e de muita dedicação e esforço. Ao longo deste percurso conheci novas pessoas, que me acolheram e partilharam comigo conhecimentos e experiências.

Deixo aqui o meu agradecimento a todos os que estiveram envolvidos na realização deste projecto e que me apoiaram de uma forma (científica) ou de outra (pessoal).

Muito obrigada:

À Professora Isabel Carreira, por me ter aceite no Laboratório como sua orientanda, pela confiança que demonstrou e me depositou e pela amizade. Obrigada também pela partilha de conhecimentos e pela estimulação científica, pelo incentivo, e pela dedicação. Pelas expectativas que cedo demonstrou ter em mim, e às quais espero conseguir corresponder!

Ao Professor Manuel do Carmo Gomes, pela disponibilidade como orientador a nível da Faculdade de Ciências e pelo esclarecimento de dúvidas.

À Catarina, pela partilha de conhecimentos e experiências, por me convencer que ia resultar e que tinha tudo para dar certo, pela amizade, pelo apoio e discussão dos resultados.

Ao Zé pela discussão crítica dos resultados quando algo não estava certo e pela partilha de conhecimentos práticos e teóricos.

A todos os restantes colegas do laboratório: Dr.^a Eunice e Dr.^a Joana; Miguel, Nuno, Lúcia, Marta, Xana e Ana Jardim do cariotipador; Carla, Sandra e Sónia da secretaria; Cláudia, Ana Lourenço e Patrícia da manipulação. Muito obrigada a todos pelo vosso carinho, amizade, ajuda, ensinamentos e brincadeiras.

Ao Dr. Miguel Oliveira pela ajuda com a pesquisa dos *primers* para a reacção de sequenciação e à Doutora Rosário Almeida pela disponibilidade e auxílio com o esclarecimento de dúvidas de sequenciação.

Ao Dr. Martinho, à D. Olívia e ao Dr. João do Centro de Histocompatibilidade do Centro, pela disponibilidade de utilização do sequenciador para a análise das amostras de sequenciação. Obrigada também pelo interesse demonstrado quando surgiam problemas nos resultados, pelas sugestões para os tentar resolver e pelos reagentes cedidos para desvendar onde estaria o problema.

À Equipa Médica do Serviço de Genética do Hospital Pediátrico pelos casos de X-Frágil, e principalmente ao Professor Doutor Jorge Saraiva pela enorme prontidão na entrega dos resultados de *Southern blot*.

Às Dras. Fernanda Águas, Fernanda Gerales e Joana Almeida do Serviço de Ginecologia da Maternidade Bissaya Barreto pela colaboração no estudo, pelos casos de menopausa precoce e pelos dados clínicos das pacientes.

À Doutora Guiomar pela disponibilidade e rapidez de resposta na avaliação dos casos de autismo.

Aos meus pais, por me apoiarem e me terem apoiado desde sempre, por quererem o melhor para mim e pelos valores que me inculcaram ao longo da minha formação.

Ao meu namorado, pelo amor, carinho, amizade, compreensão e apoio incondicionais. Por me conseguir fazer sorrir nos momentos mais difíceis, por me conhecer e compreender como ninguém. Por tudo.

Resumo

A nível da sua região 5'UTR o gene *FMR1*, localizado em Xq27.3, pode possuir um número variável de repetições CGG. Ao ultrapassar as 200 repetições a forma alélica designa-se de mutação completa e é responsável pelo Síndrome do X-Frágil, a causa mais comum de atraso mental hereditário, devido a hipermetilação do gene. A forma alélica de pré-mutação, que pode conter entre 55 e 200 nucleótidos, tem sido identificada em mulheres com insuficiência ovárica primária (POI), estimando-se que o risco de ocorrência seja cerca de 20 vezes superior em mulheres portadoras de pré-mutação. Existe também uma estreita relação entre X-Frágil e autismo, característica clínica de alguns pacientes com X-Frágil, sendo que estudos recentes reportam uma taxa de autismo superior em indivíduos com pré-mutação relativamente a indivíduos com alelos normais, não sendo no entanto os resultados conclusivos. É assim fundamental determinar qual a forma alélica presente, dado que cada uma está associada a um síndrome distinto.

Este estudo teve como objectivo (i) avaliar duas novas metodologias de diagnóstico independentes mas complementares, análise de fragmentos e MS-MLPA, pois uma permite determinar o número de repetições CGG e a outra o grau de metilação do gene, e (ii) testar a utilidade da sequenciação para o estudo das formas alélicas do gene *FMR1*. Três populações distintas foram alvo de estudo: uma composta por pacientes que necessitavam de um diagnóstico de X-Frágil, a segunda composta por mulheres com POI e a terceira por pacientes autistas. Das 20 mulheres com POI analisadas, 4 revelaram a presença de alelos de dimensão superior ao normal, enquanto que no grupo de autismo nenhum paciente apresentou alelos pré-mutados ou mutados.

O uso complementar das três técnicas permitiu reduzir a necessidade de realizar *Southern* blot como metodologia de diagnóstico para apenas 2% dos casos. A pesquisa de alelos pré-mutados em mulheres com insuficiência ovárica é importante, pois permite identificar mulheres em risco de transmitir alelos mutados à descendência.

Palavras-chave: Síndrome do X-Frágil; insuficiência ovárica primária; autismo; novas metodologias de diagnóstico; número de repetições CGG.

Abstract

On its 5' untranslated region, *FMR1* gene, located in Xq27.3, can have a variable number of CGG repeats. When the repeat number exceeds 200, the allelic form is designated by full mutation and is responsible by Fragile X Syndrome, the most common form of inherited mental retardation, due to gene hypermethylation. Premutations can have between 55 and 200 trinucleotides and have been identified in women with primary ovarian insufficiency (POI), being estimated that the recurrence risk is 20 times higher in premutation carriers. There is also a correlation between Fragile X and autism, which is a clinic characteristic of some Fragile X patients, with some studies reporting a significantly higher rate of autism in premutation carriers compared with normal allele carriers, but the results are not quite conclusive. So, it is fundamental to determine the allelic form present, as each one is associated with a distinct syndrome.

The objective of this study was (i) to evaluate two new independent but complementary diagnostic methodologies, fragment analysis and MS-MLPA, since one allows the determination of the CGG repeat number and the other the degree of methylation of the gene, and (ii) to test the use of sequencing for the study of *FMR1* allelic forms. Three distinct populations were studied: a group of patients that needed Fragile X diagnosis, a second one that included women with POI and the third one formed by autistic patients. In the 20 studied women with POI, 4 presented alleles bigger than normal, while in the autistic group none of the patients revealed premutation or full mutation alleles.

The complementary use of the three techniques allowed us to reduce the necessity to perform *Southern* blot analysis to only 2% of cases. Searching for premutation alleles in women with POI should always be considered, as it allows the identification of women in risk of transmitting full mutation alleles to their descendents.

Key-words: Fragile X Syndrome; primary ovarian insufficiency; autism; new diagnostic methodologies; CGG repeat number.

Abreviaturas

5'UTR	5' untranslated region
CGG	Citosina-Guanina-Guanina
CHC	Centro Hospitalar de Coimbra
DNA	Deoxyribonucleic acid
ddNTP	Dideoxyribonucleoside triphosphate
dNTP	Deoxyribonucleoside triphosphate
DSM-IV	Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders – Fourth Edition
EDTA	Ethylenediamine tetraacetic acid
<i>FMR1</i>	Fragile X Mental Retardation gene 1
FMRP	Fragile X Mental Retardation Protein
FSH	Follicle-stimulating hormone
FXTAS	Fragile X-associated tremor ataxia syndrome
HP	Hospital Pediátrico
MBB	Maternidade Bissaya Barreto
MLPA	Multiplex ligation - dependent probe amplification
MS-MLPA	Methylation specific – multiplex ligation - dependent probe amplification
PCR	Polymerase chain reaction
POF	Premature ovarian failure
POI	Primary ovarian insufficiency
RNA	Ribonucleic acid
RNA _m	Messenger ribonucleic acid
SXF	Síndrome do X-Frágil

Índice

I. Introdução	1
1. O gene <i>FMR1</i>	1
2. Síndrome do X-Frágil	2
3. Falência ovárica precoce	3
4. Diagnóstico Laboratorial.....	4
5. Objectivos	5
II. Materiais e Métodos	7
6. Pacientes	7
7. Métodos	7
7.1. Extracção de DNA	7
7.2. Análise de fragmentos	8
7.3. Sequenciação	8
7.4. MS-MLPA	9
III. Resultados e Discussão	10
8. Extracção de DNA.....	10
9. Análise de fragmentos.....	10
10. Sequenciação	16
11. MS-MLPA.....	22
IV. Conclusão	30
V. Bibliografia	31

Lista de Figuras

Figura 1. Fotografia de gel de agarose resultante da electroforese de 6 amostras.....	11
Figura 2. Electroferograma resultante da análise das amostras correspondentes aos poços 2 (A) e 5 (B) da figura 1.	11
Figura 3. Electroferograma resultante da análise da amostra correspondente ao poço 1 do gel de agarose da figura 1.	12
Figura 4. Electroferograma resultante da análise de uma amostra do sexo feminino com 23 e 42 repetições CGG.	13
Figura 5. Electroferograma resultante da análise de uma amostra do sexo feminino com resultado inconclusivo.	14
Figura 6. Gráfico ilustrativo da percentagem das diferentes formas alélicas determinadas recorrendo à nova metodologia de análise de fragmentos.	15
Figura 7. Fotografia de gel de agarose resultante da electroforese do produto da primeira reacção de PCR.....	17
Figura 8. Gráfico ilustrando a distribuição de alelos do gene <i>FMR1</i> nos 3 grupos de acordo com o número de repetições CGG determinadas por sequenciação.....	21
Figura 9. Gráfico ilustrando a alteração da percentagem das diferentes formas alélicas determinadas após análise por sequenciação.	22
Figura 10. Electroferograma de MS-MLPA resultante da análise de uma amostra de um paciente do sexo masculino com mutação completa	23
Figura 11. Electroferograma de MS-MLPA resultante da análise de uma amostra de um paciente do sexo masculino normal.....	24
Figura 12. Electroferograma de MS-MLPA resultante da análise de uma amostra de um paciente do sexo feminino normal.	25
Figura 13. Gráfico ilustrando a distribuição final das formas alélicas determinadas após análise por MS-MLPA.	28

Lista de Tabelas

Tabela 1. Características de 4 pacientes do grupo II com alelos de dimensão superior ao normal.....	15
Tabela 2. Resultados de sequenciação para os 3 grupos de amostras e para a população total de alelos relativamente ao número de repetições AGG, posição da primeira interrupção e padrões de interrupção.	20
Tabela 3. Percentagens de metilação esperadas em amostras normais de ambos os sexos para as diferentes sondas com local de restrição.	26

I.Introdução

1. O gene *FMR1*

Identificado em 1991¹, o gene Fragile X Mental Retardation 1 (*FMR1*) possui a particularidade de estar envolvido em três síndromes com características clínicas distintas, Síndrome do X-Frágil (SXF), falência ovárica precoce (POF - premature ovarian failure) e Síndrome do tremor/ataxia associado ao X-Frágil (FXTAS - Fragile X tremor/ataxia associated syndrome), que afectam grupos etários e géneros diferentes². O gene pode ocorrer sob quatro formas alélicas distintas, definidas consoante o número de repetições do trinucleótido CGG presentes a nível da região 5'UTR (untranslated region), às quais foram atribuídas as designações normal, intermédia, pré-mutação e mutação completa³.

Os alelos normais, meiótica e mitoticamente estáveis, possuem um número de repetições polimórfico, que pode variar entre 6 e 54 trinucleótidos CGG⁴, sendo a dimensão média mais comum 30 repetições⁵. Estas são interrompidas por um trinucleótido AGG a cada 9/10 CGG, que deverá ser responsável pela ancoragem da região durante a replicação, evitando o deslizamento da cadeia⁵.

Alelos de dimensão intermédia possuem entre 41 e 58 repetições, apesar de não existir consenso relativamente à gama de dimensões⁶, não estando, geralmente, associados a uma transmissão instável, mas podendo ser potenciais precursores de mutações completas em gerações futuras⁵.

A forma alélica de pré-mutação pode conter entre 55 a 200 trinucleótidos, sendo instável na sua transmissão de progenitor para descendente, e podendo expandir quer para uma pré-mutação de maior dimensão quer para mutação completa, mas apenas por transmissão materna⁷. Contrariamente aos alelos normais, estes alelos possuem tipicamente um número elevado de repetições CGG não interrompido por AGG⁸. Cerca de 1 em cada 250 mulheres e 1 em cada 800 homens são portadores desta forma alélica⁹.

A última forma alélica, mutação completa, caracteriza-se por possuir um número de repetições superior a 200, causando hipermetilação dos resíduos de citosina da própria repetição e da ilha CpG da região promotora a montante, com consequente silenciamento génico e ausência de proteína⁸.

O gene possui tal designação após ter sido identificado como sendo o responsável pelo SXF, quando presente sob a forma alélica de mutação completa, a única a ser associada inicialmente a uma manifestação fenotípica anormal⁸. No entanto, recentemente, a forma alélica de pré-mutação tem sido também associada a outros dois síndromes: POF e FXTAS⁶.

2. Síndrome do X-Frágil

O SXF é a causa mais comum de atraso mental hereditário e, a seguir ao Síndrome de Down, é a segunda causa mais comum de atraso mental geneticamente determinado¹⁰. É também responsável por cerca de 30% dos casos de atraso mental associados ao cromossoma X¹¹, afectando 1 em cada 4000 homens e 1 em cada 8000 mulheres¹², sendo todos os grupos étnicos susceptíveis, apesar de existirem variações entre as populações³.

Descrito pela primeira vez em 1943 por Martin e Bell, numa família com atraso mental ligado ao sexo, apenas em 1977 foi descrito o primeiro método laboratorial de diagnóstico citogenético, um meio de cultura deficiente em ácido fólico ou timidina essencial para a expressão do local frágil, que induzia uma constrição no braço longo do cromossoma X dos pacientes, em Xq27.3, e daí a designação da doença⁸.

Em 98% dos casos, a base molecular responsável pela doença consiste na expansão de um trinucleótido CGG instável na região 5'UTR do gene, que ultrapassa as 200 repetições³. Apesar da região codificante do gene permanecer intacta, a alteração estrutural causada pelo excesso de repetições CGG provoca a metilação da região promotora, impedindo assim a expressão do gene⁸. Consequentemente, a proteína Fragile X Mental Retardation (FMRP) não será expressa⁸. FMRP é uma proteína de ligação ao RNA, responsável pelo transporte de RNAm do núcleo para o citoplasma, formando complexos ribonucleoproteicos e associando-se com ribossomas em tradução⁶, cuja ausência despoleta uma cascata de eventos ainda desconhecida e responsável pelos sintomas característicos da doença¹³.

O SXF apresenta um padrão de segregação complexo, e o facto de afectar homens e mulheres sugere um padrão de hereditariedade dominante ligado ao cromossoma X⁸. A instabilidade da sequência repetitiva verificada em alelos pré-mutados aumenta o risco de expansão de uma pré-mutação para mutação completa numa só geração, risco que aumenta exponencialmente com o número de repetições⁷. Esta situação explica o fenómeno de antecipação da doença, também designado por Paradoxo de Sherman, e que consiste no facto de o número de indivíduos clinicamente afectados por SXF aumentar em gerações sucessivas de uma mesma família⁷. Surpreendentemente, alelos pré-mutados só sofrem expansão para mutação completa quando transmitidos por via materna, e não por via paterna⁷.

Sendo uma doença ligada ao cromossoma X, dado que as mulheres sofrem um mecanismo de inactivação aleatório de um dos dois cromossomas X que possuem, a severidade da doença é variável consoante a percentagem de inactivação de cromossomas X

com a mutação, mas cerca de um terço das mulheres portadoras de mutação é gravemente afectada pelo SXF³.

Clinicamente o diagnóstico é difícil de estabelecer, pois as características dismórficas associadas ao Síndrome, desde face longa, mandíbula proeminente, a orelhas de grande dimensão e macroorquidismo (testículos de grande dimensão), são muitas vezes subtis, sendo que o atraso mental pode também variar de leve a profundo⁸. O diagnóstico é ainda dificultado pela presença de características comportamentais e cognitivas transversais a outras síndromes, como alterações emocionais e comportamentais, desde hiperactividade, a movimentos estereotipados e contacto visual reduzido, semelhantes ao comportamento de uma criança autista⁸.

A associação entre SXF e autismo remonta à década de 80, estimando-se que cerca de 30% dos pacientes com SXF apresentam um comportamento autista¹⁴. A relação contrária, ou seja, a percentagem de SXF em pacientes autistas, não é, no entanto, tão consensual, havendo autores que dizem não haver qualquer relação enquanto outros dizem que a associação é significativa¹⁴. Alterações do espectro autista, geralmente variantes ligeiras das alterações observadas em indivíduos com mutações completas, têm sido reportadas em indivíduos com pré-mutação, tendo um estudo de Farzin e colaboradores em 2006 revelado uma taxa superior de autismo em indivíduos portadores de pré-mutação, comparativamente a um grupo de indivíduos controlo sem pré-mutação¹⁵.

Este resultado alerta para a necessidade de pesquisar alelos pré-mutados ou mutados em crianças com espectro autista, mesmo que não apresentem características fenotípicas óbvias de SXF¹⁵.

3. Falência ovárica precoce

Falência ovárica precoce é definida como uma disfunção ovárica precoce caracterizada pela cessação espontânea da menstruação antes dos 40 anos de idade e que afecta 1% das mulheres¹⁶. O diagnóstico é estabelecido na presença de níveis hormonais de FSH (follicle-stimulating hormone) superiores a 40 mIU/ml¹⁷, detectados em duas ocasiões distintas¹⁸. Recentemente, diversos autores têm considerado que o termo *falência ovárica precoce* deve ser substituído por insuficiência ovárica primária (primary ovarian insufficiency - POI), devido à diversidade de manifestações clínicas que caracterizam esta condição¹⁹. Este termo contempla o facto de muitas mulheres sofrerem períodos de remissão, e de a sua função ovárica não ter terminado no momento do diagnóstico, permitindo ainda que muitas engravidem^{19,20}.

As causas desta situação são bastante heterogêneas, e podem ter origem auto-imune, infecciosa, iatrogénica ou genética²¹, incluindo-se nesta categoria aneuploidias e alterações cromossómicas estruturais, especificamente do cromossoma X²². Investigações a nível molecular em mulheres com POI e em animais transgénicos têm também identificado mutações em genes candidatos para esta condição¹⁸. Um dos genes identificados é precisamente o gene *FMR1*, cuja forma alélica pré-mutada tem sido associada à doença²¹. Diversos estudos realizados até à data revelam que a taxa de POI entre mulheres com pré-mutação é de aproximadamente 20%, o que representa um risco 20 vezes superior comparativamente a mulheres com alelo normal e mesmo com mutação completa, em que a percentagem de mulheres com POI é também de 1%²³. Estudos para determinar a frequência de portadoras de pré-mutação em mulheres com POI têm revelado valores distintos, que variam desde 3%²⁴ a 10%²⁵.

A pesquisa de alelos pré-mutados em mulheres com POI permite a identificação de famílias em risco para SXF e a prevenção da transmissão de alelos com mutação completa²².

4. Diagnóstico Laboratorial

Com a descoberta da base molecular do SXF, o diagnóstico citogenético convencional deixou de ser utilizado, em parte também devido ao elevado número de falsos positivos e negativos que gerava, e começaram a ser utilizadas técnicas moleculares para análise directa da repetição envolvida⁸. Estas têm como principal objectivo determinar a dimensão da repetição do trinucleótido e o grau de metilação do gene, sendo as técnicas padrão actualmente utilizadas no diagnóstico da doença *Southern blot* e PCR (polymerase chain reaction)⁸.

A análise por *Southern blot* permite obter uma estimativa de baixa resolução do número de repetições, classificando o alelo numa das quatro categorias possíveis e, simultaneamente, uma determinação precisa do estado de metilação do gene⁶. Utilizando uma enzima de restrição sensível à metilação é possível distinguir entre alelos metilados e não metilados, pois não haverá clivagem mediante metilação³. É no entanto uma técnica laboriosa, que necessita de maior quantidade de DNA comparativamente ao PCR, e pode não detectar a presença de pré-mutação devido à inactivação do cromossoma X³.

A análise por PCR utiliza *primers* que ladeiam o fragmento de DNA que contém a sequência repetitiva, permitindo a sua amplificação, sendo a dimensão dos produtos indicativa do número aproximado de repetições presente em cada alelo do indivíduo em análise³. É um método rápido, que utiliza pequenas quantidades de DNA, e permite determinar a dimensão

correcta dos alelos normais, intermédio e pré-mutado⁸, não sendo afectado pela inactivação aleatória do cromossoma X³. A eficiência da reacção está inversamente relacionada com o número de repetições CGG³, devido às estruturas secundárias que se formam, sendo as mutações completas difíceis de amplificar e podendo mesmo não ser detectadas desta forma⁵. Esta técnica também não fornece informação acerca do estado de metilação do gene³, nem permite a detecção de mosaicos com alelos normais e pré-mutados, devido a amplificação diferencial, pelo que os indivíduos são incorrectamente identificados como normais⁸.

A avaliação da presença de forma alélica pré-mutada em mulheres com menopausa precoce é também realizada com recurso às mesmas metodologias. No entanto, como o objectivo principal é pesquisar especificamente a presença de pré-mutação, poderá ser realizado apenas PCR, que permitirá uma identificação correcta em cerca de 80% dos casos, reduzindo assim os custos associados²⁶.

5. Objectivos

Não sendo o Síndrome do X-Frágil facilmente diagnosticado recorrendo apenas às características fenotípicas que lhe estão associadas, é necessário recorrer a um diagnóstico a nível molecular que permita avaliar o número de trinucleótidos, identificando assim a forma alélica presente e o grau de metilação do gene *FMR1*. A evolução das metodologias de Biologia Molecular e a sua aplicação ao diagnóstico clínico levou a um aumento da exigência e das solicitações por parte das equipas médicas, que requerem cada vez mais um diagnóstico preciso, fiável e, principalmente, rápido. De forma a responder a tais solicitações é constantemente necessário implementar novas metodologias laboratoriais de diagnóstico, que assegurem resultados rápidos e exactos. Para tal, a metodologia a implementar necessita de ser previamente avaliada, sendo os resultados com ela obtidos comparados com os resultados da metodologia em vigor e que se pretende substituir, de forma a assegurar que a metodologia em avaliação é precisa e fiável para ser usada de forma isolada.

O objectivo principal deste trabalho foi exactamente avaliar novas metodologias de diagnóstico laboratorial para o Síndrome do X-Frágil, de forma a poder implementá-las no laboratório. Tais metodologias são independentes mas complementares, dado que uma permite determinar com precisão o número de repetições do trinucleótido CGG e a outra avaliar a metilação do gene *FMR1*.

A primeira metodologia, análise de fragmentos, recorre a uma reacção de PCR capaz de amplificar alelos de dimensão superior aos amplificados nas actuais reacções de PCR,

reduzindo o número de casos que necessitam de ser analisados por *Southern blot*, e permitindo determinar com exactidão o número de repetições do trinucleótido, essencial para determinar a forma alélica presente. A técnica baseia-se na análise dos fragmentos resultantes da reacção de PCR que contêm a sequência repetitiva, e determinação do número de repetições do trinucleótido CGG a partir da dimensão destes fragmentos²⁷. Com a aplicação da técnica, e à medida que os resultados foram sendo comparados com os de *Southern blot*, surgiu a necessidade de avaliar se o número de repetições CGG determinados pela nova metodologia era realmente exacto. Para tal, as amostras em estudo foram sujeitas a uma reacção de sequenciação, que permite analisar com exactidão a sequência repetitiva, e determinar se o número de repetições determinado pela nova metodologia corresponde à realidade.

A segunda técnica, designada de Methylation-Specific Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MS-MLPA) consiste numa reacção de PCR multiplex, que, com base no fundamento da técnica de MLPA²⁸, permite avaliar o grau de metilação do gene *FMR1*. A técnica baseia-se na utilização de diversas sondas de DNA, específicas do gene *FMR1*, contendo algumas delas o local de restrição de uma enzima sensível à metilação². Após hibridização das sondas com o alvo, a mesma amostra é sujeita a duas reacções distintas, uma em que as sondas são digeridas por acção da enzima de restrição *HhaI* e outra não digerida, sendo que a comparação do padrão de fragmentos dos dois casos, após PCR das sondas que permanecem intactas, permite avaliar se o gene se encontra ou não metilado².

As amostras utilizadas para esta avaliação fazem parte de um grupo de crianças e adolescentes com características fenotípicas associadas a SXF, que necessitavam de um diagnóstico a nível molecular. Adicionalmente, dois outros grupos foram também alvo de estudo, consistindo o segundo num grupo de mulheres com menopausa precoce, de modo a pesquisar a presença de forma alélica pré-mutada e sua associação com POI. O terceiro grupo, composto por 64 crianças com características do espectro autista, foi avaliado relativamente à forma alélica do gene *FMR1* presente, de modo a avaliar a necessidade futura de pesquisar alelos pré-mutados e mutados mediante um quadro clínico de autismo.

Com este projecto, um grupo diverso de pacientes foi alvo de estudo relativamente ao gene *FMR1*, com os objectivos de poder oferecer novas metodologias de diagnóstico rápidas e eficazes, de determinar a incidência de alelos pré-mutados em mulheres com POI, e também de caracterizar a população estudada relativamente às formas alélicas mais comuns.

II. Materiais e Métodos

6. Pacientes

Na totalidade, 154 pacientes pertencentes a três grupos distintos foram analisados:

Grupo I – composto por 70 pacientes com idades compreendidas entre os 1 e os 32 anos (\bar{x} = 8 anos e 9 meses), seguidos na consulta de Genética do Hospital Pediátrico do Centro Hospitalar de Coimbra (HP-CHC) para diagnóstico de Síndrome de X-Frágil.

Grupo II – composto por 20 mulheres com menopausa precoce, encaminhadas a partir da consulta de Ginecologia da Maternidade Bissaya Barreto (MBB), Centro Hospitalar de Coimbra (\bar{x} = 36 anos de idade aquando da menopausa). O estudo foi aprovado pela direcção da MBB, e cada paciente forneceu, por escrito, o seu consentimento informado para o estudo em questão. No anexo A é possível consultar o exemplar do questionário realizado a cada paciente.

Grupo III – composto por 64 casos de crianças com manifestações do espectro autista (\bar{x} = 9 anos), seguidos na consulta de Genética do HP-CHC.

Em todos os casos foi feita uma caracterização clínica dos pacientes e recolhida uma amostra de sangue em EDTA, para posterior extracção de DNA.

7. Métodos

7.1. Extracção de DNA

O primeiro passo do procedimento experimental consistiu em extracção de DNA genómico a partir de linfócitos de sangue periférico, por um método de extracção em colunas realizado de acordo com as instruções do fabricante (Jetquick DNA Midi Spin kit – Genomed, Germany). Apenas 20 das amostras analisadas foram extraídas por um método diferente, extracção por fenol-clorofórmio, pois foram casos cedidos por outro laboratório e já com um diagnóstico estabelecido relativamente a Síndrome do X-Frágil, que serviram para uma primeira avaliação da nova metodologia. Após extracção, todas as amostras foram quantificadas e o grau de pureza determinado utilizando um espectrofotómetro Nanodrop 1000 (Thermo Scientific, USA).

7.2. Análise de fragmentos

A nova metodologia de análise de fragmentos em avaliação foi aplicada de acordo com as instruções da Abbott (Abbott Laboratories, USA), empresa responsável pelo desenvolvimento do novo kit específico para diagnóstico laboratorial de Síndrome de X-Frágil.

A metodologia divide-se em 3 etapas distintas: reacção de PCR, reacção de purificação e análise e interpretação dos resultados. A reacção de PCR utiliza um par de *primers* específicos para o gene *FMR1*, que se encontram marcados com um fluorocromo permitindo a sua análise em sequenciador automático, e *primers* específicos para os cromossomas sexuais, permitindo assim determinar o género de cada amostra. Após purificação das amostras sujeitas a PCR, a análise deve ser feita de duas formas, num gel de agarose a 2%, que permite avaliar o sucesso da reacção de PCR, e em sequenciador automático, de forma a determinar com precisão a dimensão do fragmento e o número de repetições CGG²⁷.

Para cada amostra em análise são obtidos 3 fragmentos, que diferem consoante o género da amostra e o número de repetições do trinucleótido CGG presentes. Amostras do sexo feminino possuem sempre um fragmento com dimensão aproximada de 200 pb específico do cromossoma X, enquanto que amostras do sexo masculino possuem, além deste, um fragmento com dimensão aproximada de 170 pb específico do cromossoma Y. Os restantes fragmentos, dois no caso das mulheres e um no caso dos homens, são específicos da região repetitiva do gene *FMR1*, possuindo uma dimensão mínima de 193pb, acrescida do número total de pares de bases correspondente ao número de trinucleótidos CGG presentes²⁷.

A dimensão dos fragmentos é determinada por comparação com um padrão de dimensão molecular, designado por ROX 1000.

As amostras foram analisadas com o software GeneScan num sequenciador ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, USA) e a reacção de PCR realizada num termociclador ABI 2720 (Applied Biosystems, USA).

7.3. Sequenciação

Como para qualquer reacção de sequenciação, foi necessário realizar em primeiro lugar uma reacção de PCR utilizando *primers* específicos do gene *FMR1* que amplificam a região contendo a sequência repetitiva CGG e 222 pb de regiões flanqueadoras. Os *primers* utilizados, *primer* directo (C) 5'-GCTCAGCTCCGTTTCGGTTTCACTTCCGGT-3, *primer* reverso (F) 5'-AGCCCCGCACTTCCACCACCAGCTCCTCCA-3' (Invitrogen, USA) assim como as condições da

reação, foram de acordo com o descrito por Wilson e colaboradores, 2008, apenas com a alteração de duas unidades de enzima GC-rich para uma unidade, confirmando a presença de produto específico em gel de agarose a 2%²⁹. Procedeu-se de seguida a uma reação de purificação enzimática com ExoSAp (USB Corporation, USA), seguida de PCR de sequenciação. Este foi realizado utilizando 2 µl de BigDye Terminator sequencing kit, versão 3.1 (Applied Biosystems, USA), 2 µl de produto pós-PCR e 1 µl de *primer* (100µmol/L) num volume final de 10 µl. Para cada amostra foram realizados dois PCR, cada um contendo apenas um dos *primers*, de forma a analisar separadamente a sequência reversa e directa. As condições do PCR foram de acordo com o descrito por Wilson e colaboradores, 2008, sendo o produto final sujeito a uma reação de purificação através de colunas Performa DTR Gel Filtration Cartridges (Edge BioSystems, USA)²⁹. As amostras foram sequenciadas num sequenciador ABI PRISM 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, USA). Ambas as reações de PCR foram realizadas num termociclador ABI 2720 (Applied Biosystems, USA).

7.4. MS-MLPA

A reação de MLPA foi realizada utilizando a Salsa MS-MLPA KIT MEO29-B1 *FMR1/AFF2* (MRC-Holland, Netherlands)³⁰. O DNA genómico dos pacientes analisados foi sujeito à reação descrita pelo fabricante, apenas com a alteração no número de ciclos, de 37 em vez de 35 ciclos, de forma a potenciar os resultados. As reações de PCR foram realizadas num termociclador ABI 2720 (Applied Biosystems, USA), e as amostras analisadas num sequenciador ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, USA) com o auxílio do software GeneScan (Applied Biosystems, USA) para quantificar os picos gerados. Os dados extraídos foram posteriormente analisados no software de análise Coffalyser (MRC-Holland, Netherlands), disponibilizado pelo fabricante, e que permite determinar a percentagem de metilação do gene *FMR1* de cada paciente em estudo.

III. Resultados e Discussão

8. Extracção de DNA

A extracção de DNA é um passo crucial, dado que fornecerá o material para toda a análise a realizar posteriormente. A avaliação de cada amostra relativamente à sua concentração e grau de pureza é essencial para avaliar a *performance* das reacções posteriores, sendo que uma amostra de boa qualidade deve possuir um grau de pureza entre 1.8 e 2.0, dado pelo quociente entre a absorvância a 260 e 280 nm³¹, e uma concentração mínima de 20 ng/μl.

Os valores médios da concentração de DNA e de pureza para o total de amostras analisadas foram, respectivamente, 60.56 ng/μl e 1.88. Todas as amostras possuíam assim DNA de qualidade e em quantidade suficiente para permitir uma análise correcta pelas técnicas propostas.

9. Análise de fragmentos

A aplicação da nova técnica de análise de fragmentos às 70 amostras de X-Frágil em estudo (Grupo I) foi feita de forma cega, ou seja sem conhecimento prévio dos resultados obtidos por *Southern blot*, de forma a não influenciar a interpretação dos resultados. Após ter sido feita a análise dos resultados estes foram comparados com os de *Southern*, de forma a verificar a eficácia da técnica.

Durante a aplicação da metodologia, verificou-se que, para muitas amostras, a sua análise em gel de agarose não permitia obter um resultado conclusivo devido à ausência do fragmento específico do gene *FMR1* ou dos fragmentos do género. Na figura 1 é possível observar tal situação, pois nos poços 1, 2 e 5 apenas se visualiza o fragmento específico do gene *FMR1*, estando os fragmentos do género, aos 170 pb e 200 pb, ausentes.

Tal resultado poderia sugerir falha na reacção de amplificação, mas ao analisar as mesmas amostras em sequenciador automático, obteve-se um resultado completo, com todos os fragmentos esperados presentes, como observável na figura 2. Isto sugere que a quantidade de produto pós-PCR obtida nestes casos não é suficientemente elevada para ser detectada em gel de agarose, mas suficiente para obter um resultado completo e conclusivo através da análise em sequenciador, devido à elevada sensibilidade e capacidade de resolução deste aparelho.

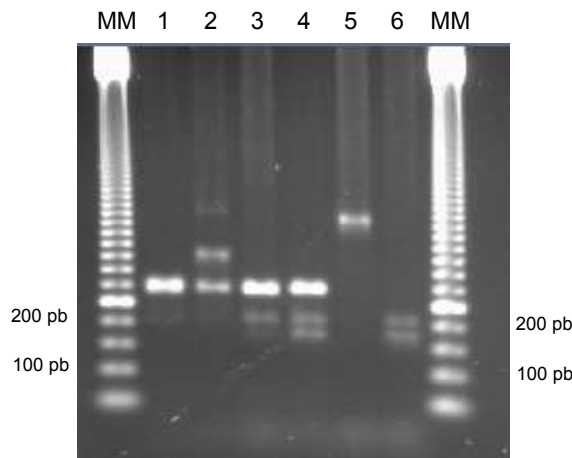


Figura 1. Fotografia de gel de agarose resultante da electroforese de 6 amostras.

MM – Marcador Molecular de 50 pb

Poços 1,2,3 – Amostras do sexo feminino

Poços 4,5,6 – Amostras do sexo masculino

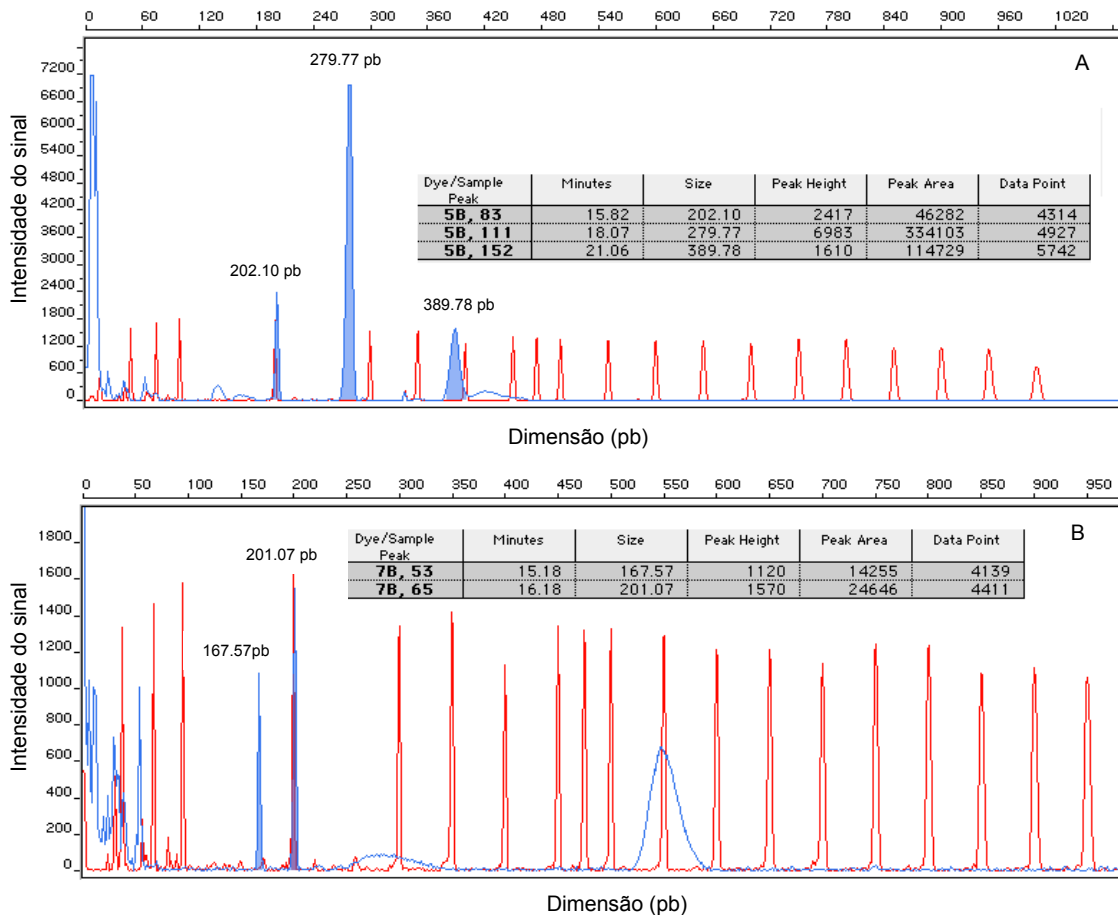


Figura 2. Electroferograma resultante da análise das amostras correspondentes aos poços 2 (A) e 5 (B) da figura 1. A azul estão representados os 3 fragmentos esperados, relativos ao género e ao gene *FMR1*, e a vermelho os fragmentos do padrão de peso molecular, ROX1000.

A. Amostra do sexo feminino (fragmento específico do cromossoma X aos 202 pb) com dois fragmentos (279 e 389pb) contendo a sequência repetitiva do gene *FMR1*;

B. Amostra do sexo masculino (fragmento específico de Y aos 167 pb e de X aos 201 pb) e fragmento específico do gene *FMR1* (550pb).

A análise em gel de agarose de amostras do sexo feminino não possui também resolução suficiente para distinguir alelos com número de repetições muito próximo entre si, revelando apenas um único fragmento, como o caso do poço 1 da figura 1, que mediante análise no sequenciador automático demonstra tratar-se de dois fragmentos distintos, como comprova a figura 3.

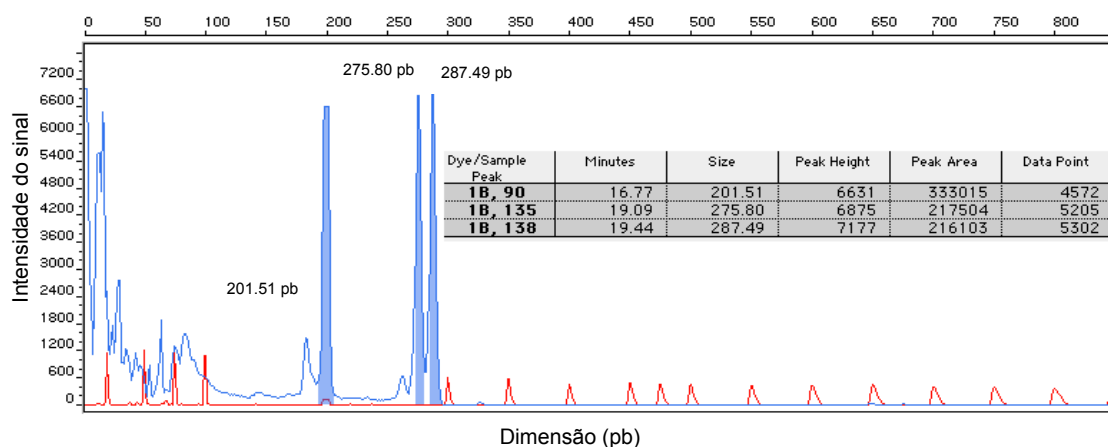


Figura 3. Electroferograma resultante da análise da amostra correspondente ao poço 1 do gel de agarose da figura 1. É possível concluir que se trata de uma amostra do sexo feminino, devido à presença do fragmento aos 201 pb, não detectado no gel de agarose, com dois fragmentos do gene *FMR1* aos 275 pb e 287 pb, correctamente resolvidos.

A partir da dimensão dos fragmentos específicos do gene *FMR1* obtidos é necessário calcular o número de repetições CGG contidas no alelo em análise. Excluindo a dimensão da sequência repetitiva, o fragmento amplificado contém aproximadamente 193 pb de dimensão, pelo que é necessário subtrair este valor à dimensão total do fragmento. A diferença corresponde ao número total de pares de bases da sequência repetitiva, pelo que ao dividir tal valor por 3, já que se trata de um trinucleótido, obtém-se o número de repetições CGG presentes no alelo do paciente em estudo.

Por exemplo, a figura 4 representa o resultado obtido para uma mulher, em que estão presentes o fragmento específico do cromossoma X aos 202 pb, e os dois fragmentos do gene *FMR1*. Para calcular o número de repetições CGG em cada alelo procede-se do seguinte modo:

Primeiro alelo: $261.68 \text{ pb} - 193 \text{ pb} = 68.68 / 3 = 22.89$ repetições CGG

Segundo alelo: $317.69 \text{ pb} - 193 \text{ pb} = 124.69 / 3 = 41.56$ repetições CGG

Conclui-se assim que se trata de uma mulher com um alelo normal e um alelo intermédio, com, respectivamente, 23 e 42 repetições do trinucleótido CGG.

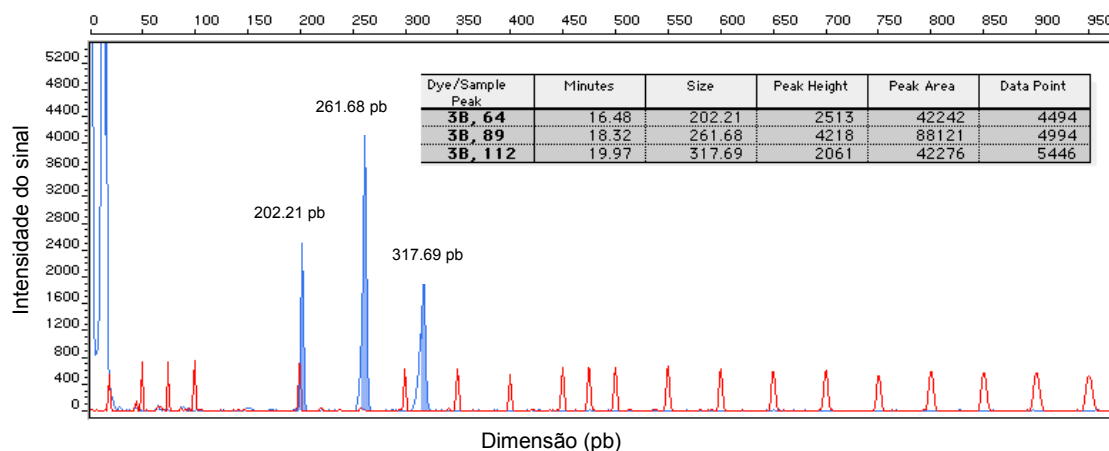


Figura 4. Electroferograma resultante da análise de uma amostra do sexo feminino com 23 e 42 repetições CGG.

Esta técnica foi aplicada a todas as amostras do Grupo I e II, e os resultados obtidos analisados de modo a determinar o número de repetições do trinucleótido CGG e, consequentemente, as formas alélicas presentes. Em ambos os grupos, para algumas das amostras do sexo feminino analisadas não foi possível obter um resultado conclusivo, pois apenas se obteve um fragmento específico do gene *FMR1*. A figura 5 ilustra um desses casos, em que não é possível distinguir se se trata de uma amostra homozigótica normal, ou seja, em ambos os cromossomas X o número de repetições CGG é idêntico, possuindo os fragmentos a mesma dimensão, ou de uma amostra com mutação completa, em que o segundo fragmento se encontra ausente devido ao elevado conteúdo de repetições CGG que dificultam, ou impedem mesmo, a sua amplificação.

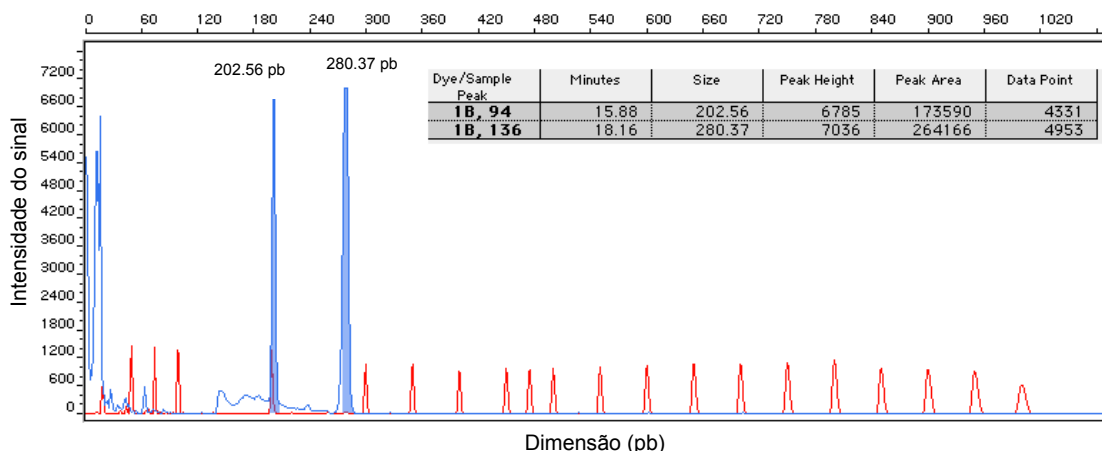


Figura 5. Electroferograma resultante da análise de uma amostra do sexo feminino com resultado inconclusivo. O resultado obtido não é esclarecedor, pois apenas se observa um fragmento específico do gene *FMR1* (280.37 pb), contendo cerca de 29 repetições, não permitindo esclarecer se se trata de uma amostra de uma paciente homozigótica normal ou de uma paciente com mutação completa.

Em aproximadamente um quarto dos casos de amostras do sexo feminino o resultado obtido por esta metodologia não é esclarecedor. Em três amostras do sexo masculino, não se obteve qualquer resultado para a amplificação do fragmento do gene *FMR1* contendo a sequência repetitiva. Excluída a hipótese de se tratar de uma falha na amplificação, visto que se obteve resultado para os fragmentos do género e para fragmentos de *FMR1* de outras amostras analisadas simultaneamente, supõe-se que os pacientes sejam portadores de uma mutação completa, cujo elevado conteúdo GC impediu a sua amplificação. Da totalidade dos 90 casos que compõem os grupos I e II, não foi possível obter um resultado conclusivo em 15 amostras, 12 do sexo feminino e 3 do sexo masculino. Não sendo o resultado conclusivo nas amostras do sexo feminino e nas amostras do sexo masculino a ausência de resultado insuficiente para comprovar que se trata de uma mutação, os resultados obtidos para estes casos nas restantes técnicas serão discutidos posteriormente.

Sendo as amostras do grupo I destinadas a validar a nova técnica, a análise por *Southern blot* era simultaneamente requisitada pela equipa médica para todos os casos, de forma a possibilitar a comparação dos resultados. Pelo contrário, as amostras do grupo II seriam apenas para pesquisar a presença de alelo pré-mutado, pelo que a análise por *Southern blot* não estava prevista. No entanto, de forma a esclarecer os resultados inconclusivos obtidos em 5 das 20 pacientes, solicitou-se o reencaminhamento destas pacientes para a consulta de genética de forma a ser requisitada a análise por *Southern blot*. Apenas foi possível estabelecer tal análise em 3 senhoras, que revelaram um resultado normal. Além de pesquisa de pré-

mutação, para todas as pacientes do grupo II foi também estabelecido o seu cariótipo, devido à história clínica de menopausa precoce.

De forma a calcular sensibilidade e especificidade da nova metodologia de análise de fragmentos é necessário excluir as 15 amostras em que não foi possível obter um resultado conclusivo. Das 75 amostras com resultado em análise de fragmentos, todos foram concordantes com o resultado de *Southern blot* e negativos para SXF, pelo que a especificidade da técnica é de 100%, uma vez que identifica correctamente os casos negativos. No entanto a sua sensibilidade é de 0% pois a técnica não permite detectar casos positivos de SXF, devido ao elevado conteúdo GC.

No total das 90 amostras dos Grupos I e II estudadas desta forma, analisaram-se 134 alelos. A figura 6 ilustra a distribuição das frequências alélicas obtidas, sendo que em 11.2% dos alelos analisados não foi possível determinar qual a forma alélica em estudo, correspondendo estes alelos às 15 amostras anteriormente referidas.

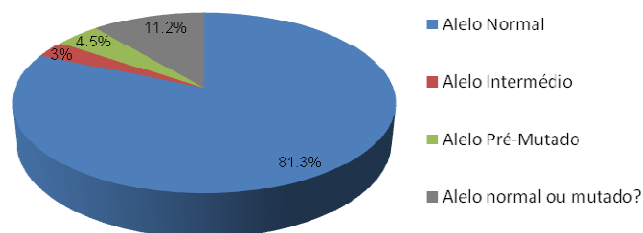


Figura 6. Gráfico ilustrativo da percentagem das diferentes formas alélicas determinadas recorrendo à nova metodologia de análise de fragmentos.

Nas 20 amostras de POI do grupo II, três pacientes possuíam alelos de dimensão intermédia (entre 41 e 58 repetições) e uma paciente possuía uma pré-mutação (entre 55 e 200 repetições). A tabela 1 apresenta algumas das características das pacientes em questão.

Tabela 1. Características de 4 pacientes do grupo II com alelos de dimensão superior ao normal.

Caso	Idade Menopausa	Número de repetições	História familiar
1	38 anos	23,42	Mãe e avó materna com POI
2	35 anos	29,41	Irmã falecida com autismo
3	39 anos	41,42	Sem clínica relevante
4	39 anos	16,69	Filho com X-Frágil Mãe com POI Irmão com atraso mental

Apesar de a grande maioria dos estudos reportar apenas associação entre POI e forma alélica pré-mutada, um estudo de Streuli e colaboradores de 2008 sugere que alelos com número de repetições superior a 40 CGG são mais frequentes em pacientes com insuficiência ovárica do que em controlos²⁰. Em 27 mulheres com insuficiência ovárica analisadas, 6 (22.2%) apresentavam alelos de dimensão superior a 40 repetições, comparativamente a apenas uma (3.1%) num grupo de 32 mulheres controlo²⁰.

Os resultados obtidos no presente estudo são semelhantes aos de Streuli, uma vez que se obteve uma percentagem de 20% das pacientes com alelos de dimensão superior a 40 repetições. Tendo em conta estes resultados e a história familiar dos casos 1 e 2, não se deverá excluir a possibilidade de existir associação entre a forma alélica intermédia e a situação de insuficiência ovárica primária. No entanto, para verificar tal associação, seria necessário aumentar a amostragem e estabelecer comparação com um grupo de mulheres controlo sem POI. Apesar de não ter sido possível analisar os familiares do caso 4, esta família ilustra as particularidades do gene *FMR1* e das suas diferentes formas alélicas: a paciente com POI portadora de um alelo pré-mutado instável, provavelmente herdado da sua progenitora, transmitiu um alelo mutado ao seu descendente.

Sendo que as pacientes 1 e 3 possuem ambas filhas, seria importante avaliar qual as suas formas alélicas, pois as progenitoras possuem alelos que poderão ter sofrido expansão geracional, transmitindo alelos intermédios de maior dimensão ou mesmo pré-mutados à descendência. Estas poderão assim ser portadoras de alelos altamente instáveis e que, por expansão geracional, poderão ser responsáveis por Síndrome de X-Frágil.

10. Sequenciação

Conforme já referido, todas as amostras analisadas por sequenciação são alvo de duas reacções de PCR, a primeira com o objectivo de amplificar a região contendo a sequência repetitiva do gene *FMR1*, e a segunda como reacção de sequenciação do fragmento gerado, em que são incorporados ddNTP'S fluorescentemente marcados, que emitem fluorescência a diferentes comprimentos de onda. A totalidade das 154 amostras foi analisada desta forma, sendo que nos grupos I e II o objectivo foi determinar se o número de repetições obtido pela nova metodologia em estudo era exacto, e no grupo III foi o método utilizado para determinar o número de repetições CGG do gene *FMR1*. Para todas as amostras foram analisados os padrões de interrupção CGG-AGG, o número de repetições AGG presentes e a localização da primeira interrupção AGG relativamente aos trinucleótidos CGG.

A primeira reacção de PCR é avaliada em gel de agarose, confirmando-se a presença de fragmentos específicos. Na figura 7 é possível observar um resultado típico de electroforese de amostras sujeitas à primeira reacção de PCR, em que são visíveis os fragmentos do gene *FMR1*, um no caso de amostras do sexo masculino e dois no caso de amostras do sexo feminino, e de dimensão variável consoante o número de repetições CGG presentes.

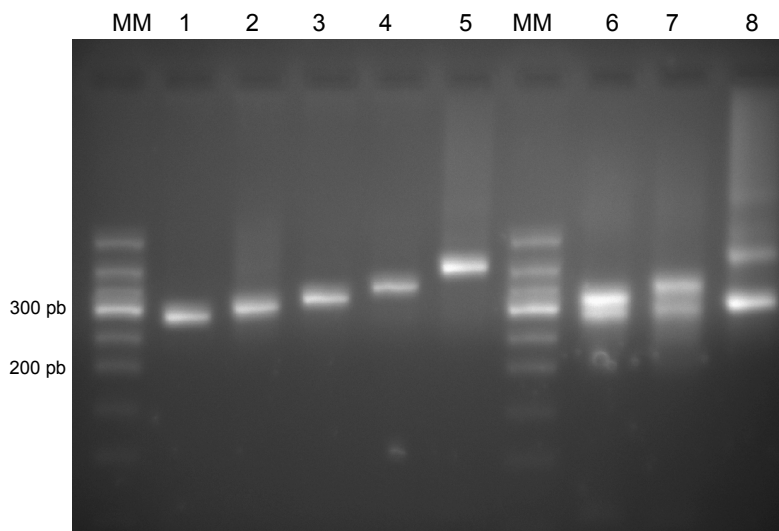


Figura 7. Fotografia de gel de agarose resultante da electroforese do produto da primeira reacção de PCR.

MM – Marcador Molecular de 50 pb

Poços 1 a 5 – Amostras do sexo masculino

Poços 6 a 8 – Amostras do sexo feminino

Após confirmação da presença de produto de PCR específico, as amostras foram sujeitas ao PCR de sequenciação, estando o resultado tipicamente obtido representado na figura A1 do Anexo B. A análise da sequência permite determinar com exactidão o número de repetições CGG e avaliar também a presença e localização do trinucleótido AGG, conforme descrito na literatura.

Relativamente às amostras dos grupos I e II, analisadas por ambas as técnicas, é possível verificar se o número de repetições obtido em ambas é ou não coincidente, e avaliar assim a eficácia de determinação do número de repetições da metodologia de análise de fragmentos em estudo. Dos 134 alelos presentes nas 90 amostras que compõem os dois grupos, não foi possível obter resultados de sequenciação de 15 alelos, 10 alelos intermédios e pré-mutados e 5 alelos mutados. Note-se que estes alelos, apesar de serem também 15, não são necessariamente os mesmos 15 alelos correspondentes às 15 amostras anteriormente referidas das quais também não se obteve resultado por análise de fragmentos, pois os motivos

de falha são distintos. Nas mutações não se obteve resultado logo na primeira reacção de PCR, avaliada em gel de agarose, devido ao elevado conteúdo GC, enquanto que nas pré-mutações, apesar de estar presente o produto específico do alelo em causa, na reacção de sequenciação a sequência do fragmento contendo a região repetitiva não foi totalmente sequenciada, pelo mesmo motivo de elevado conteúdo GC. Dos alelos em que foi possível obter um resultado em ambas as técnicas, em 66.1% dos casos o número de repetições obtido nas duas técnicas é coincidente, enquanto que em 33% das amostras os resultados da nova técnica diferem, por defeito, em uma repetição dos resultados de sequenciação, e apenas em uma amostra (0.9%) a variação é de duas repetições. Sob a hipótese nula de que o número de repetições obtido por análise de fragmentos não difere do número de repetições obtido por sequenciação mais do que seria de esperar por mero acaso (e/ou devido a erros aleatórios cometidos pelo observador), realizou-se o teste de Wilcoxon (Wilcoxon signed ranks test)³². A estatística de teste obtida usando apenas as classes com valor positivo, $T^+ = 67$, não rejeita a hipótese nula a um nível de confiança de 95%³². Assim, pode dizer-se que a variação de um trinucleótido CGG obtida entre as duas metodologias em 33% das amostras não é significativa.

Nas 64 amostras do grupo III, 5 pacientes do sexo masculino apresentaram alelos intermédios entre 41 e 46 repetições CGG, apresentando a extremidade 3' entre 21 a 25 repetições CGG puras, ou seja, não interrompidas pelo trinucleótido AGG. Estas sequências terão sido possivelmente geradas por perda de uma interrupção AGG durante a meiose de um dos progenitores, confirmando a existência de instabilidade polar na extremidade 3'^{33,34}. Não foi detectada nenhuma mutação completa, o que indica que nenhum dos pacientes analisados sofre de Síndrome do X-Frágil. Relativamente aos 5 casos com pré-mutação, em termos clínicos não existe qualquer diferença entre estes pacientes e os restantes que permita estabelecer associação entre a forma alélica presente e a gravidade do fenótipo autista. Dado que estes pacientes em nada diferem da população geral de autismo, pode dizer-se que, neste caso, não há qualquer associação entre a presença das formas alélicas intermédias encontradas e o fenótipo de autismo.

Uma revisão da literatura, permite verificar que desde a década de 80 que existem estudos sobre a associação X-Frágil – Autismo. No entanto, como referido anteriormente, os estudos existentes até à data analisando esta relação não são conclusivos, pois enquanto uns revelam não haver qualquer associação entre as duas condições^{35,36,37}, outros revelam que entre 7%^{38,39} e 12.5%^{40,41} dos autistas são portadores de alelos mutados do gene *FMR1*. Uma das justificações possíveis para estes resultados incompatíveis poderia ser a técnica de diagnóstico utilizada, análise citogenética *versus* análise molecular, em que uma delas tivesse

sido preferencialmente utilizada em estudos que revelam associação e a outra nos estudos que não revelam. No entanto, tal não se verifica, pois para ambas as técnicas uns estudos revelam resultados positivos e outros resultados negativos. Dado que a maioria dos estudos data dos anos 80, em que era utilizada a análise citogenética para identificação do local frágil, os resultados obtidos podem não ser totalmente fiáveis devido às dificuldades do protocolo de cultura na indução do local frágil, à probabilidade de ocorrência de falsos positivos e falsos negativos, à reduzida percentagem de expressão do local frágil no cromossoma X e mesmo à possibilidade de ocorrerem locais frágeis em autossomas que se assemelham ao local frágil do cromossoma X⁴². Devido ao problemas inerentes ao diagnóstico citogenético, não é assim possível avaliar se os resultados publicados são realmente fiáveis, e se as percentagens de casos de mutação em pacientes com autismo são realmente reais.

Já com análise molecular, os estudos existentes revelam resultados diametralmente opostos, dado que dois revelam que cerca de 7% e 12% dos pacientes com autismo apresentam alelo mutado^{38,40} enquanto que outro, em 109 pacientes autistas nenhum possui alelos de dimensão superior a 36 repetições CGG³⁵. Estas divergências podem ser devidas a diferenças na dimensão da amostra e aos próprios critérios de classificação e selecção dos pacientes autistas. Quando referidos nos artigos, os critérios de diagnóstico de autismo utilizados correspondem ao DSM-IV (Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders - Fourth Edition), em que, pelo menos, seis comportamentos de três domínios distintos devem estar presentes para ser estabelecido um diagnóstico de autismo⁴³. No entanto, nunca é referido se amostra em estudo é uniforme relativamente ao número de comportamentos presentes, ou se existem pacientes que apresentam um maior número de comportamentos dos 12 possíveis, tendo assim um fenótipo mais grave, o que seria também interessante para verificar se haveria uma correlação entre a severidade da manifestação clínica de autismo, dada pelo número de comportamentos presentes, e a presença de alelos pré-mutados.

Relativamente à caracterização das amostras quanto ao número de repetições AGG, localização da primeira interrupção e padrão de interrupção CGG-AGG, a tabela 2 contém os resultados obtidos para cada grupo (I, II e III) e para a população total de alelos analisados. Os resultados dizem respeito à sequência lida na orientação 5'-3'.

Tabela 2. Resultados de sequenciação para os 3 grupos de amostras e para a população total de alelos relativamente ao número de repetições AGG, posição da primeira interrupção e padrões de interrupção.

Característica		Grupo I – X-Frágil	Grupo II – POI	Grupo III – Autismo	População total
Número de repetições AGG	0	2.3%	---	2.9%	2.14%
	1	37.2%	45.5%	19.1%	32.09%
	2	60.5%	54.5%	76.5%	65.24%
	3	---	---	1.5%	0.53%
Posição da primeira interrupção AGG	8º	---	---	3%	1.09%
	9º	1.2%	3%	1.5%	1.64%
	10º	28.5%	27.3%	27.3%	27.87%
	11º	58.3%	51.5%	65.2%	59.56%
	12º	1.2%	---	---	1.64%
	13º	1.2%	6.1%	---	2.73%
	14º	6%	12.1%	3%	3.83%
	17º	1.2%	---	---	0.55%
	22º	1.2%	---	---	0.55%
	34º	1.2%	---	---	0.55%
Padrões de interrupção	Mais comuns	10+1+9+1+9 21.4%	10+1+9+1+9 21.2%	10+1+9+1+9 39.4%	10+1+9+1+9 27.9%
		9+1+9+1+9 16.7%	10+1+9 15.2%	10+1+9 9.1%	10+1+9 10.9%
		10+1+9 10.7%		10+1+9+1+10 7.6%	9+1+9+1+9 9.3%
	Total de padrões	31 em 84 alelos	18 em 33 alelos	23 em 66 alelos	53 em 183 alelos

A maioria das amostras, quer em cada grupo quer na população geral, possui duas repetições AGG intercaladas com CGG, resultado semelhante ao publicado noutros estudos em que este valor ultrapassa os 50%^{34,44,45,46}. Também em mais de metade das amostras, a primeira interrupção AGG localiza-se na décima primeira posição, ou seja, após 10 repetições CGG, sendo a décima posição, após 9 CGG, a segunda mais comum. Duas amostras de pacientes do sexo masculino normais do grupo I, possuem a primeira interrupção AGG ao fim de 21 e 33 repetições CGG na extremidade 5', resultado inesperado uma vez que está documentado que tal número de repetições CGG não intercalado por AGG possa ocorrer não na extremidade 5' mas sim 3', que apresenta maior instabilidade. Quanto aos padrões de interrupção, apesar de uma ligeira diferença entre os três grupos, os padrões mais comuns na população geral são 10+1+9+1+9, 10+1+9 e 9+1+9+1+9, em que o sinal + indica a localização do trinucleótido AGG. Estes padrões são variáveis consoante as amostras em análise e consoante o método utilizado mas, os resultados obtidos, são semelhantes aos de um estudo de Capelli e colaboradores em 2005, cuja análise foi também realizada por sequenciação⁴⁵.

Outros estudos realizados utilizam um método de análise que não sequenciação, pelo que não é possível estabelecer comparações entre os resultados^{34,44}.

Na figura 8 está representada, para cada grupo, a distribuição de alelos do gene *FMR1* de acordo com o número de repetições CGG analisadas por sequenciação. Devida à reduzida dimensão da amostra, o grupo II é o que apresenta menor variabilidade relativamente ao número de repetições CGG presentes. Nos três grupos, a grande maioria das amostras possui 30 repetições CGG, resultado compatível com o facto de estes serem os alelos de dimensão mais comum⁵, seguindo-se as 29, 20 e 31 repetições CGG como as que possuem maior representação de alelos nos três grupos e, consequentemente, na população total de alelos analisados.

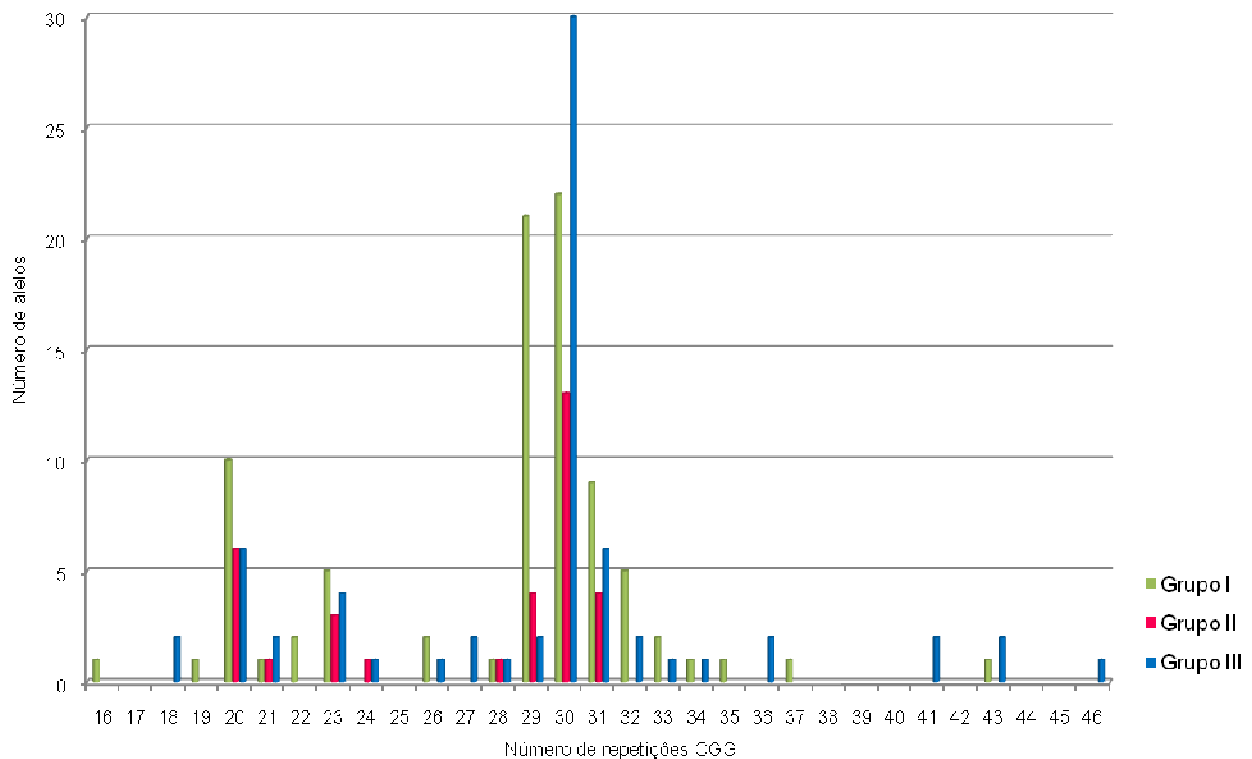


Figura 8. Gráfico ilustrando a distribuição de alelos do gene *FMR1* nos 3 grupos de acordo com o número de repetições CGG determinadas por sequenciação.

Relembrando as 15 amostras referidas na secção 9 sobre as quais não se obteve resultado com a nova metodologia de análise de fragmentos, 3 do sexo masculino com ausência de amplificação e 12 do sexo feminino com resultado inconclusivo, para as 3 amostras do sexo masculino não se obteve também resultado no primeiro PCR avaliado em gel de agarose, reforçando assim a ideia de que as amostras em causa deverão ser portadoras de

mutação completa. Das doze amostras do sexo feminino foi possível determinar qual a segunda forma alélica presente em seis. Nestas, o resultado de sequenciação possui duas sequências distintas, ou seja, foi possível ler a sequência de duas cadeias de DNA que diferiam entre si de um trinucleótido e possuíam padrões de interrupção AGG distintos, permitindo assim concluir que as amostras são normais. Das restantes seis, o resultado de sequenciação não foi também conclusivo, pois estava presente apenas uma sequência, o que, mais uma vez, não permite concluir se se trata de uma amostra homozigótica, quer em número de repetições CGG quer no padrão de interrupções AGG, ou de uma amostra com um alelo mutado não amplificado. Foi possível reduzir assim de 11.2% para 6.7% a percentagem de alelos de forma desconhecida, ilustrando a figura 9 as alterações nas percentagens de formas alélicas.

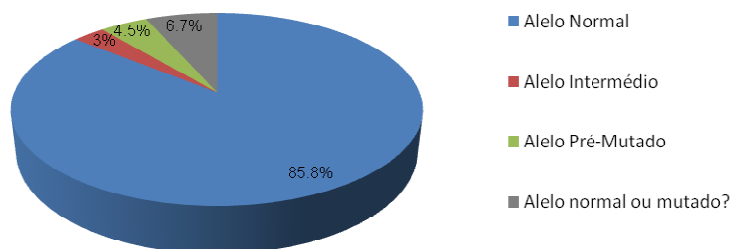


Figura 9. Gráfico ilustrando a alteração da percentagem das diferentes formas alélicas determinadas após análise por sequenciação.

A análise por sequenciação do número de repetições do trinucleótido CGG do gene *FMR1* permitiu esclarecer 50% dos casos com resultado de PCR inconclusivo em amostras do sexo feminino, pois possibilitou a análise das duas cadeias de DNA presentes e a sua distinção ao nível do nucleótido, quer do número de repetições CGG quer da posição das interrupções AGG.

11. MS-MLPA

Como referido anteriormente, as mulheres sofrem um mecanismo de inactivação aleatório de um dos dois cromossomas X que possuem, sendo que, teoricamente, devido a esta situação, 50% dos alelos normais se encontram metilados³⁰. Na presença de mutação completa, este valor de metilação aumenta até 75%, pois além do cromossoma X inactivo, o cromossoma X com a mutação estará também metilado³⁰. Esta situação dificulta a detecção de mutação completa apenas com base na análise de metilação, pois esta pode corresponder

simplesmente à inativação do cromossoma X com número de repetições normal para o gene *FMR1*³⁰. No entanto, em amostras do sexo masculino, toda a percentagem de metilação obtida será apenas devida à metilação do gene *FMR1* por expansão do trinucleótido CGG³⁰.

Para testar esta situação, amostras de ambos os sexos e com as várias formas alélicas foram analisadas por MS-MLPA. Quando o DNA alvo das sondas utilizadas se encontra metilado, devido à forma alélica de mutação completa, o híbrido DNA metilado-sonda não é clivado por ação da enzima de restrição sensível à metilação, pelo que não haverá diferença entre o padrão de fragmentos da amostra digerida e da amostra não digerida. Todos os fragmentos contendo o local de restrição obtidos numa situação estão presentes na outra, o que, no caso de amostra do sexo masculino, permite concluir que se trata de uma amostra metilada, mesmo sem análise com o software coffalyser. O resultado obtido na análise de uma amostra do sexo masculino com mutação completa está representado na Figura 10.

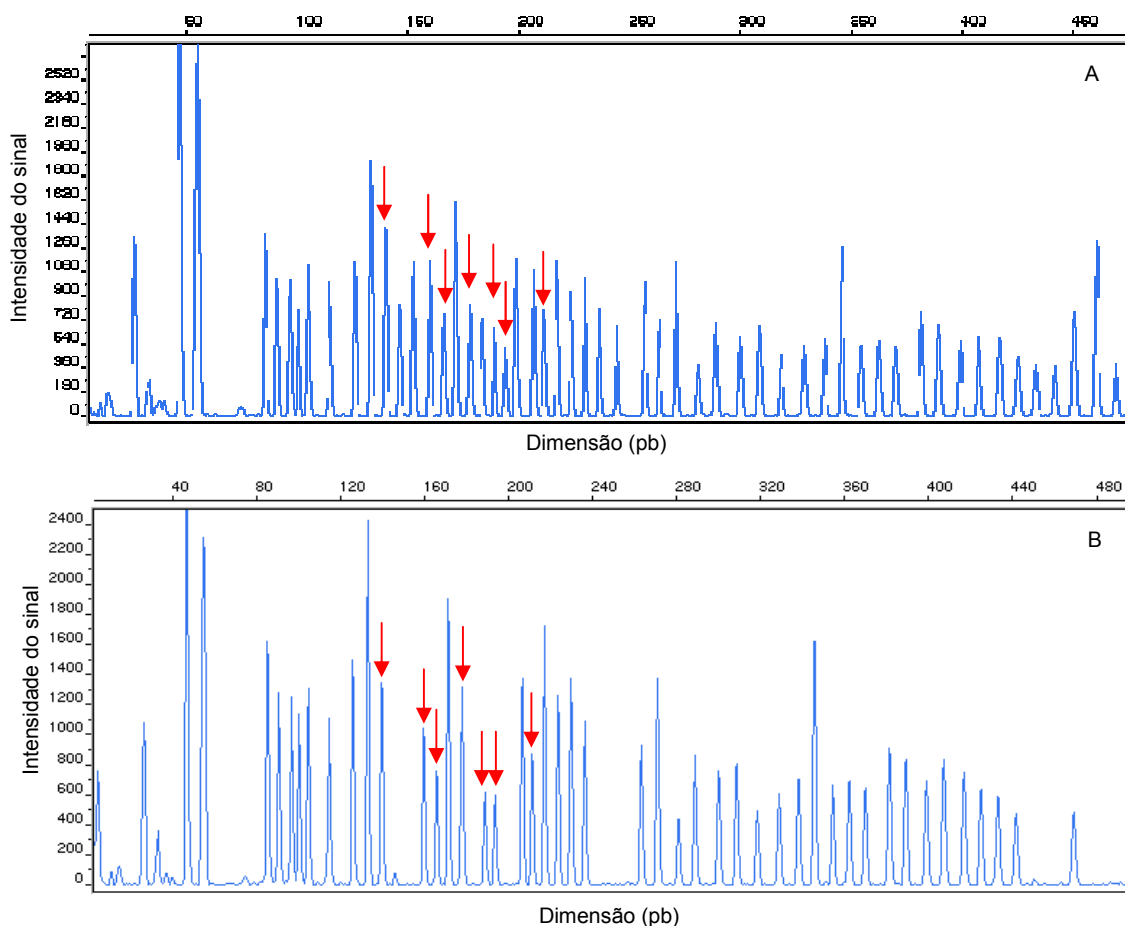


Figura 10. Electroferograma de MS-MLPA resultante da análise de uma amostra de um paciente do sexo masculino com mutação completa. A imagem A corresponde ao padrão obtido na ausência de enzima, estando os fragmentos correspondentes às sondas com local de restrição assinalados. A

imagem B demonstra o padrão obtido na presença de enzima, verificando-se que todos os fragmentos com local de restrição se encontram presentes, o que indica que se encontravam metilados, não tendo por isso sido clivados.

Uma amostra de um paciente do sexo masculino normal, e portanto não metilada, sujeita a digestão, terá um padrão distinto da amostra não digerida, apresentando um menor número de fragmentos. A enzima de restrição clivará os híbridos DNA não metilado-sonda, eliminando estas sondas que não serão assim amplificadas, permitindo, mais uma vez, detectar apenas visualmente que se trata de uma amostra normal, não metilada. A amostra não sujeita a digestão terá todas as sondas presentes, como demonstra o resultado da figura 11.

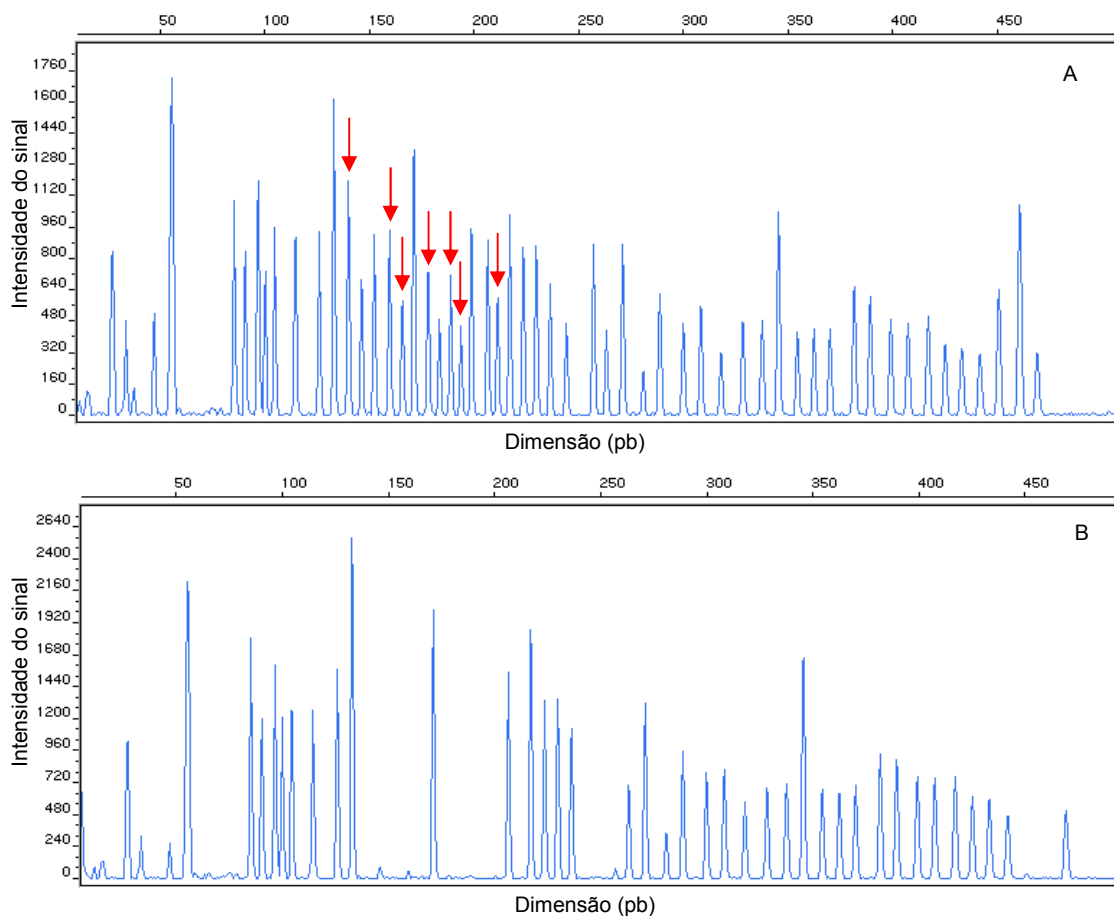


Figura 11. Electroferograma de MS-MLPA resultante da análise de uma amostra de um paciente do sexo masculino normal. A imagem A corresponde ao padrão obtido na ausência de enzima, estando os fragmentos correspondentes às sondas com local de restrição assinalados. A imagem B demonstra o padrão na presença de enzima, verificando-se a ausência dos fragmentos não metilados, alvo de digestão.

Em amostras do sexo feminino a análise não é tão linear, pois com base apenas no padrão de fragmentos não é possível concluir se se trata de uma amostra metilada ou não, precisamente devido ao mecanismo de inativação do cromossoma X. Na amostra sujeita a digestão é possível observar um decréscimo na fluorescência das sondas com local de restrição, comparativamente à amostra não digerida, o que indica que alguns dos híbridos DNA-sonda foram sujeitos a clivagem por não se encontrarem metilados, representando a figura 12 o resultado tipicamente obtido.

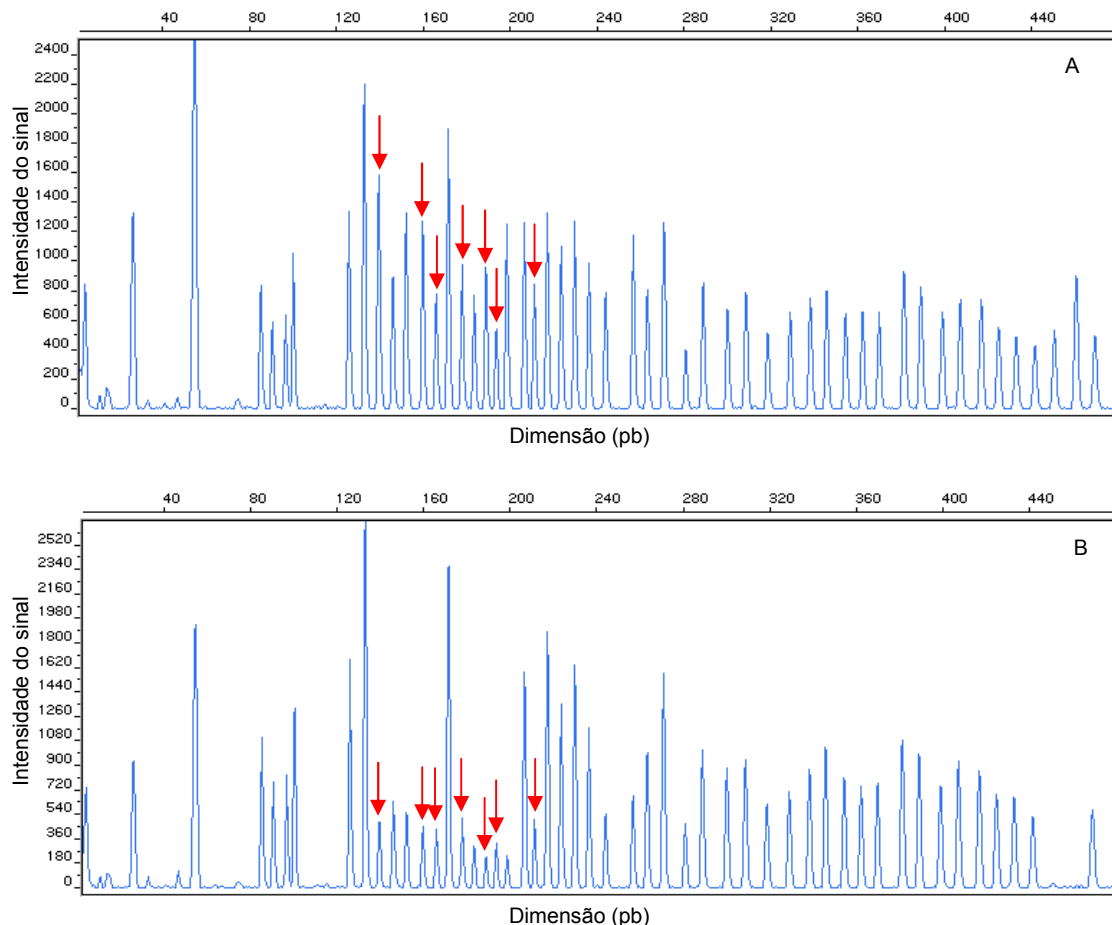


Figura 12. Electroferograma de MS-MLPA resultante da análise de uma amostra de um paciente do sexo feminino normal. A imagem A corresponde ao padrão de fragmentos obtido na ausência de enzima, estando os fragmentos correspondentes às sondas com local de restrição assinalados. A imagem B demonstra o padrão após digestão, verificando-se uma diminuição da intensidade de fluorescência dos fragmentos com local de restrição, o que reflecte a ocorrência de digestão parcial.

No entanto, a análise do grau de metilação só é possível através do software coffalyser, que exprime a percentagem de metilação do gene após comparar alterações na intensidade de fluorescência das sondas de ambos os padrões digerido e não digerido. Mais à frente serão dados exemplos de resultados obtidos por análise de amostras com o software.

Estas e outras amostras foram analisadas com o software Coffalyser que permite avaliar a percentagem de metilação do gene *FMR1*, através do quociente entre a intensidade de fluorescência das sondas com local de restrição de ambas as amostras, digerida e não digerida, do mesmo paciente. Na tabela 3 estão indicadas as percentagens de metilação esperadas em amostras normais de ambos os sexos para as sondas do gene *FMR1* com local de restrição³⁰. Comparando os valores obtidos com estes valores é possível concluir se a amostra se encontra ou não metilada.

Tabela 3. Percentagens de metilação esperadas em amostras normais de ambos os sexos para as diferentes sondas com local de restrição.

Sonda	Percentagem de metilação em amostras normais	
	Sexo masculino	Sexo feminino
<i>FMR1</i> probe 03727-L03187	0%	43%
<i>FMR1</i> probe 03725-L13188	1%	39%
<i>FMR1</i> probe 03722-L03182	1%	30%
<i>FMR1</i> probe 12916-L14361	0%	45%
<i>FMR1</i> probe 12915-L14360	1%	27%
<i>FMR1</i> probe 04037-L03722	0%	18%
<i>FMR1</i> probe 12918-L12030	1%	30%

A tabela A1 do Anexo C exemplifica o resultado obtido após análise de 13 amostras com o software, em que cada coluna de valores corresponde a uma amostra, indicando esses valores a metilação da respectiva sonda. A vermelho estão destacadas as sondas específicas do gene *FMR1* com local de restrição, pelo que a análise dos seus valores permite avaliar o grau de metilação do gene. As colunas 1 e 2 apresentam valores de metilação que variam entre 0% e 4%, o que, comparativamente aos valores estabelecidos para uma amostra de um paciente do sexo masculino normal, permite concluir seguramente que ambos os pacientes (N1 e N2) são normais, pois não apresentam metilação do gene. As colunas 3 e 4 correspondem a duas das três amostras de pacientes do sexo masculino em que a ausência de amplificação pelas técnicas anteriores sugere que se tratem de amostras portadoras de mutação completa. Os valores de metilação destas amostras são já bastante elevados, permitindo concluir que as

amostras em análise (M3 e M4) se encontram metiladas, correspondendo a amostras de pacientes com X-Frágil. Confirma-se assim que a ausência de amplificação nas duas técnicas anteriores não é devida a falha na reacção de PCR mas sim devido ao elevado conteúdo GC da mutação presente. Estas conclusões são coincidentes com as obtidas pela análise e comparação dos electroferogramas das amostras digerida e não digerida dos quatro pacientes, e com o número de repetições do trinucleótido CGG determinado para os pacientes 1 e 2.

Em amostras do sexo feminino esta análise é dificultada pela inactivação do cromossoma X, cuja metilação vai também ser determinada pelas sondas com local de restrição. Assim, numa mulher normal, os valores de metilação obtidos correspondem, não à metilação do gene *FMR1* devido à presença de uma mutação, mas sim à metilação do gene por inactivação do cromossoma X. Comparando os resultados de metilação obtidos com os esperados para uma mulher normal, é possível concluir se a amostra em análise se encontra normal ou metilada.

Nas colunas 5 e 6 estão os valores obtidos após análise de duas mulheres. Comparando estes valores com os da tabela 3, os resultados parecem indicar que se tratam de duas mulheres normais (N5 e N6), pois em ambas os valores de metilação são inferiores a 50%, e apesar de relativamente a algumas sondas os valores obtidos serem superiores aos valores referência da tabela, a diferença não parece significativa ao ponto de justificar que se esteja na presença de uma mutação completa. Esta conclusão é coincidente com o número de repetições determinado para os alelos em causa, que corresponde à gama do normal. Nas colunas 7 e 8 os valores são significativamente maiores aos valores de referência, pelo que sugerem que as amostras correspondam a mulheres com X-Frágil (M7 e M8). Estas correspondiam a duas amostras com resultado inconclusivo, quer em análise de fragmentos quer em sequenciação, que se deve assim ao facto de apenas o alelo normal ser alvo de amplificação. O resultado de MS-MLPA é coincidente com o de *Southern blot*.

As colunas 9 a 13 correspondem a amostras de mulheres cujo resultado de PCR se revelou inconclusivo, ou seja, podem corresponder a mulheres com dois alelos normais homozigóticos ou com um alelo normal e um alelo mutado. Os resultados das amostras 9 a 12 são semelhantes aos das amostras 5 e 6, em que os valores obtidos são inferiores ou muito próximos dos valores de referência, sugerindo que se tratam de amostras de mulheres normais. As amostras 10 e 11 correspondem a duas das seis amostras cujo resultado havia já sido esclarecido por sequenciação como sendo normais. O resultado das outras duas amostras foi confirmado por *Southern blot* como correspondendo a amostras do sexo feminino normais.

A figura 13 ilustra mais uma vez a alteração na distribuição das frequências alélicas após análise de MS-MLPA, que permitiu concluir qual a forma alélica em 7 dos 9 casos ainda sem resultado determinado.

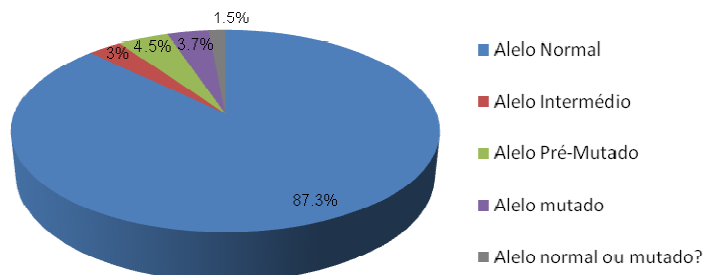


Figura 13. Gráfico ilustrando a distribuição final das formas alélicas determinadas após análise por MS-MLPA.

A coluna 13 apresenta um resultado, que, em primeira análise, sugere tratar-se de uma amostra do sexo masculino normal, devido aos valores de metilação próximos de 0%. No entanto, trata-se de uma amostra do sexo feminino pertencente ao grupo II. O resultado de PCR desta amostra foi também semelhante ao da figura 5, em que está presente apenas um fragmento específico do gene *FMR1* e o fragmento específico do género. Estes resultados não eram concordantes entre si, pois se por um lado o padrão de metilação parecia corresponder ao de uma amostra de um paciente do sexo masculino, o resultado de PCR não apresentava o fragmento específico do Y, indicando que se tratava de uma amostra do sexo feminino. Dado que, além de permitir analisar o grau de metilação do gene *FMR1*, o kit de MLPA utilizado permite também avaliar alteração do número de cópias do gene, recorrendo ao software Coffalyser, estabeleceu-se esta análise para algumas das mesmas amostras anteriormente referidas de forma a esclarecer este resultado. O resultado obtido na tabela A2 do anexo D demonstra que a amostra 13 possui perda de heterozigotia (LOH - Loss of heterozygosity) para todas as sondas localizadas em Xq27 e Xq28. Tal resultado indica que a paciente é portadora de uma deleção num dos cromossomas X que abrange a região do gene *FMR1*, resultado comprovado pela análise de carótipo, 46,X,del(X)(q26), e compatível com a presença de apenas um fragmento no resultado de PCR. Sendo uma deleção terminal, a paciente possui apenas uma cópia do gene *FMR1*, pelo que o resultado de metilação indica que esta não se encontra metilada, e que o cromossoma X com a alteração estrutural foi preferencialmente inativado. Este resultado é compatível com o fenótipo normal da paciente, excluindo a

menopausa precoce, pois se o cromossoma X normal sofresse inactivação, haveria uma redução dos níveis de FMRP, o que poderia causar atraso mental na paciente.

Não foi possível obter um resultado de MS-MLPA para todas as amostras dos grupos I e II devido a falhas não identificáveis na reacção de hibridização, apesar de terem sido consideradas diversas variáveis potencialmente responsáveis. No entanto, de todos os homens analisados (50% do total), os resultados de metilação foram concordantes com o número de repetições determinado por PCR. Por outro lado, a análise e interpretação de amostras do sexo feminino não é tão precisa e fiável pois verificam-se várias discrepâncias entre as percentagens de metilação obtidas aquando da análise de amostras normais e os valores de referência esperados numa amostra do sexo feminino normal. A sonda *FMR1 probe 03727-L03187* apresenta sempre valores de metilação reduzidos e inferiores aos valores de referência para amostras do sexo feminino normais, sendo que em mulheres com mutação os valores obtidos não são concordantes. Em homens com mutação, enquanto as restantes sondas apresentam valores elevados e compatíveis com a forma alélica presente, para esta sonda os resultados são nulos, indicando não haver metilação. A sonda *FMR1 probe 12916-L14361* apresenta, em mulheres normais, valores de metilação elevados e superiores ao que seria expectável na ausência de mutação, dando a noção de que se trata de uma mutação, e sendo discordante dos resultados das restantes sondas.

Se para análise de amostras do sexo masculino esta técnica representa uma boa alternativa à realização de *Southern blot* quando aplicada conjuntamente com PCR para análise do número de repetições, para amostras do sexo feminino será necessário realizar mais estudos. É imperativo perceber a partir de que valores de metilação se deve considerar que se está na presença de uma mutação e estabelecer um padrão correcto, com os valores limite de metilação possíveis na presença de dois alelos normais, algo possível apenas pela análise de um maior número de amostras e, quem sabe, pela optimização das sondas utilizadas e/ou da sua sequência alvo complementar.

Dos 15 alelos que inicialmente se revelaram inconclusivos, 6 foram resolvidos por sequenciação e 7 por MS-MLPA, restando apenas 2 alelos de duas amostras do sexo feminino em que não possível determinar se se tratava de um alelo normal ou de uma mutação. Em termos de amostras, tal corresponde à incapacidade de diagnosticar as formas alélicas presentes em 2 amostras de 90 casos, cerca de 2.2%, ambas do sexo feminino. A tabela A3 do Anexo E contém os resultados obtidos nas várias técnicas para as 15 amostras inicialmente inconclusivas e a conclusão final para cada uma.

IV. Conclusão

Com este projecto foi possível avaliar duas novas metodologias de diagnóstico do Síndrome de X-Frágil recentemente desenvolvidas, e ainda a utilidade da técnica de sequenciação aplicada à determinação da forma alélica do gene *FMR1*. As novas metodologias oferecem resultados complementares, dado que permitem avaliar as duas variáveis que determinam qual a forma alélica presente, número de repetições do trinucleótido CGG e metilação do gene *FMR1*, e consequentemente, um diagnóstico correcto. A metodologia de análise de fragmentos permite obter um resultado rápido e fiável em amostras do sexo masculino normais, amostras do sexo feminino com alelos normais não homozigóticos e com alelos normais, intermédios e pré-mutados, o que representa uma redução da necessidade de realizar *Southern blot* em cerca de 83% dos casos. Complementando a análise com MS-MLPA e sequenciação, é possível diagnosticar correctamente cerca de 98% dos casos, reduzindo para 2% o total de casos em que é necessário realizar *Southern blot*. Tal representa uma vantagem, pois além de permitir determinar com precisão o número de repetições CGG, permite também reduzir largamente o tempo de espera do diagnóstico.

A presença de alelos intermédios e pré-mutados num grupo de mulheres com insuficiência ovárica primária foi também pesquisada, tendo-se determinado que 20% dos casos analisados possuía formas alélicas de dimensão superior ao normal. A avaliação da forma alélica do gene *FMR1* presente em mulheres com POI tem uma dupla importância, pois além de permitir determinar a causa provável da sua situação clínica, permite também identificar mulheres em risco de transmitir mutações completas à descendência.

O estudo das formas alélicas presentes num grupo de 64 pacientes autistas revelou a presença de alelos intermédios em 5 pacientes, que não deverão ser responsáveis pelo fenótipo autista dado que não se verificam diferenças clínicas entre estes e a restante amostra. Deste resultado e dos publicados até à data, não é possível inferir sobre a necessidade de pesquisar as formas alélicas do gene *FMR1* em pacientes com autismo.

Em suma, é agora possível oferecer no laboratório um diagnóstico de Síndrome de X-Frágil fidedigno, rápido e eficaz, reduzindo largamente o número de casos que necessita de análise por *Southern blot*, um método mais complexo e moroso. Este trabalho permitiu também alertar as equipas médicas de Ginecologia sobre a importância de avaliar a forma alélica do gene *FMR1* em mulheres com insuficiência ovárica precoce e encaminhá-las para consultas de Genética.

V. Bibliografia

1. Fu YH, Kuhl DP, Pizzuti A *et al.* Variation of the CGG repeat at the fragile X site results in genetic instability: resolution of the Sherman paradox. *Cell*, 1991, 67:6:1047-1058.
2. Nygren AOH, Lens SI, Carvalho R. Methylation-Specific Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification Enables a Rapid and Reliable Distinction between Male *FMR1* Premutation and Full-Mutation Alleles. *Journal of Molecular Diagnostics*, 2008, 10:6:496-501.
3. Sherman S, Pletcher BA, Driscoll DA. Fragile X syndrome: Diagnostic and carrier testing. *Genetics in Medicine*, 2005, 7:8:584-587.
4. Gold B, Radu D, Balanko A *et al.* Diagnosis of Fragile X Syndrome by Southern Blot Hybridization Using a Chemiluminescent Probe: A Laboratory Protocol. *Molecular Diagnosis*, 2000, 5:3:169-178.
5. Maddalena A, Richards CS, McGinniss MJ *et al.* Technical Standards and Guidelines for Fragile X: The First of a Series of Disease-Specific Supplements to the Standards and Guidelines for Clinical Genetics Laboratories of the American College of Medical Genetics. *Genetics in Medicine*, 2001, 3:3:200-205.
6. Saul RA, Tarleton JC. *FMR1*-Related Disorders. *Gene Reviews*, 2008, 1-28.
7. Jin P, Warren ST. Understanding the molecular basis of fragile X syndrome. *Human Molecular Genetics*, 2000, 9:6:901-908.
8. Pandey UB, Phadke SR, Mittal B. Molecular diagnosis and genetic counseling for fragile X mental retardation. *Neurology India*, 2004, 52:1:36-42.
9. Allen EG, Sullivan AK, Marcus M *et al.* Examination of reproductive aging milestones among women who carry the *FMR1* premutation. *Human Reproduction*, 2007, 22:8:2142-2152.
10. Yim S, Jeon BH, Yang JA *et al.* Fragile X Syndrome in Korea: A Case Series and a Review of the Literature. *Journal of Korean Medical Sciences*, 2008, 23:3:470-476.
11. Giliberto F, Szijan I, Ferreiro V. Fragile-X Mental Retardation: Molecular Diagnosis in Argentine Patients. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 2006, 39:6:766-773.
12. Wattendorf DJ, Muenke M. Diagnosis and Management of Fragile X Syndrome. *American Family Physician*, 2005, 72:1:111-113.
13. Tabolacci E, Moscato U, Zalfa F *et al.* Epigenetic analysis reveals a euchromatic configuration in the *FMR1* unmethylated full mutations. *European Journal of Human Genetics*, 2008, 16:12:1487-1498.
14. Muhle R, Trentacoste SV, Rapin I. The Genetics of Autism. *Pediatrics*, 2004, 13:5:472-486.
15. Farzin F, Perry H, Hessel D *et al.* Autism Spectrum Disorders and Attention-Deficit/ Hyperactivity Disorder in Boys with the Fragile X Premutation. *Developmental and Behavioral Pediatrics Copyright*, 2006, 27:2:133-144.
16. Welt CK, Smith PC, Taylor AE. Evidence of Early Ovarian Aging in Fragile X Premutation Carriers. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 2004, 89:9:4569-4574.
17. Portnoi MF, Aboura A, Tachdjian G *et al.* Molecular cytogenetic studies of Xq critical regions in premature ovarian failure patients. *Human Reproduction*, 2006, 21:9:2329-2334.
18. Goswami D, Conway GS. Premature ovarian failure. *Human Reproduction Update*, 2005, 11:4:391-410.
19. Welt CK. Primary Ovarian Insufficiency: A More Accurate Term for Premature Ovarian Failure. *Clinical Endocrinology*, 2008, 68:4:499-509.
20. Streuli I, Fraisse T, Ibecheole V *et al.* Intermediate and premutation *FMR1* alleles in women with occult primary ovarian insufficiency. *Fertility and Sterility*, 2008, 92:2:464-470.
21. Beck-Peccoz P, Persani L. Premature ovarian failure. *Orphanet Journal of Rare Diseases*, 2006, 1:9, doi:10.1186/1750-1172-1-9.
22. Bussani C, Papi L, Sestini R *et al.* Premature ovarian failure and fragile X premutation: a study on 45 women. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*, 2004, 112:189-191.
23. Sullivan AK, Marcus M, Epstein MP *et al.* Association of *FMR1* repeat size with ovarian dysfunction. *Human Reproduction*, 2005, 20:2:402-412.
24. Conway GS, Payne NN, Webb J *et al.* Fragile X premutation screening in women with premature ovarian failure. *Human Reproduction*, 1998, 13:5:1184-1187.

25. Bodega B, Bione S, Dalprà L *et al.* Influence of intermediate and uninterrupted *FMR1* CGG expansions in premature ovarian failure manifestation. *Human Reproduction*, 2006, 21:4:952-957.
26. Wittenberger MD, Hagerman RJ, Sherman SL *et al.* The *FMR1* premutation and reproduction. *Fertility and Sterility*, 2007, 87:3:456-465.
27. Wallace A, Barton DE, van Bunderen PA *et al.* Fragile X analysis: A multi-centre assessment of the Abbott Molecular Fragile X analyte specific reagent (ASR) kit. Technology Assessment Report – Abbott Molecular Fragile X ASR, 2008, 1-105.
28. Schouten JP, McElgunn CJ, Waaijer R *et al.* Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Nucleic Acids Research*, 2002, 30:12:e57.
29. Wilson JA, Pratt VM, Phansalkar A *et al.* Consensus Characterization of 16 *FMR1* Reference Materials: A Consortium Study. *Journal of Molecular Diagnostics*, 2008, 10:1:2-12.
30. SALSA MS-MLPA KIT ME029-B1 *FMR1/AFF2*; Lot 0209. Description version 06, 28-01-2009; MRC-Holland.
31. PrathapKumar S, Sureshkumar BV. Rapid and Simple Approach to Determine Nucleic Acid Purity by Ratio method (A260/280) using Bio-Spectrophotometer, ELICO LTD., B-90, A.P.I.E. Sanathnagar, Hyderabad, India.
32. Conover WJ. Practical nonparametric statistics. John Wiley and Sons, 1999, third edition.
33. Zhong N, Yang W, Carl Dobkin *et al.* Fragile X Gene Instability: Anchoring AGGs and Linked Microsatellites. *American Journal of Human Genetics*, 1995, 57:351-361.
34. Poon P, Chen QL, Lai K *et al.* CGG Repeat Interruptions in the *FMR1* Gene in Patients with Infantile Autism. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 1998, 36:8:649-653.
35. Otsuka S, Sakamoto Y, Siomi H *et al.* Fragile X carrier screening and *FMR1* allele distribution in the Japanese population. *Brain & Development* (2009),doi:10.1016/j.braindev. 2008.12.015.
36. Fombonne E. The epidemiology of autism: a review. *Psychological Medicine*, 1999, 29:769-786.
37. Ritvo ER, Jorde LB, Mason-Brothers A, *et al.* The UCLA-University of Utah epidemiologic survey of autism: recurrence risk estimates and genetic counseling. *American Journal of Psychiatry*, 1989, 146:1032-1036.
38. Estécio M, Fett-Conte AG, Varella-Garcia M *et al.* Molecular and Cytogenetic Analyses on Brazilian Youths With Pervasive Developmental Disorders. *Journal of Autism and Developmental Disorders*, 2002, 32:1:35-41.
39. Brown WT, Jenkins EC, Cohen IL *et al.* Fragile X and autism: a multicenter survey. *American Journal of Medical Genetics*, 1986, 23:341-52.
40. Gliding H, Bolton PF, Vincent J *et al.* Molecular and Cytogenetic Investigations of the Fragile X Region Including the Frax A and Frax E CGG Trinucleotide Repeat Sequences in Families Multiplex for Autism and Related Phenotypes. *Human Heredity*, 1997, 47:254-262.
41. Fisch GS, Cohen IL, Wolf EG *et al.* Autism and the fragile X syndrome. *American Journal of Psychiatry*, 1986, 143:71-73.
42. Chetan CK, Latha P, Arathi R *et al.* Cytogenetics of Fragile X Chromosome: Autosomal Sites as Potential Markers for Fragile X Chromosome Analysis. *Indian Journal of Human Genetics*, 2001, 1:91-95.
43. Karande S. Autism: A review for family physicians. *Indian Journal of Medical Sciences*, 2006, 60:5:205-215.
44. Poon P, Chen Q, Zhong N *et al.* AGG interspersed analysis of the *FMR1* CGG repeats in mental retardation of unspecific cause. *Clinical Biochemistry*, 2006, 39:244-248.
45. Capelli L, Mingroni-Netto R, Vianna-Morgante A. Structure and stability upon maternal transmission of common and intermediate *FMR1* (Fragile X Mental Retardation 1) alleles in a sample of the Brazilian population. *Genetics and Molecular Biology*, 2005, 28:1:10-15.
46. Eichler E, Holden J, Popovich B *et al.* Length of uninterrupted CGG repeats determines instability in the *FMR1* gene. *Nature Genetics*, 1994, 8:88-94.

Anexos

Anexo A

Requisição para determinação do número de repetições do trinucleótido CGG do gene *FMR1*

1.1 Identificação do utente (pode ser colada etiqueta) Nome: _____ Data de nascimento: ____/____/____ Morada: _____	1.2 Identificação da instituição _____ 1.3 Identificação do médico Nome: _____ Rubrica: _____
---	---

2. Amostra 3ml de sangue em EDTA	Data de colheita: ____/____/____
--	----------------------------------

3. Dados clínicos Idade da menarca: _____ Ciclos menstruais regulares <input type="checkbox"/> irregulares <input type="checkbox"/> Fuma Não <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Quantos cigarros por dia? _____ Há quanto tempo é fumadora? _____ Filhos Não <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Número de rapazes _____ Número de raparigas _____ Todos normais ¹ ? Não <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Teve dificuldades em engravidar? Não <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Qual a patologia? _____ Fez algum tipo de tratamento? Não <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Qual? _____ Sofreu algum aborto espontâneo? Não <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Quantos? _____ Idade gestacional? _____ Idade da menopausa _____ Foi lhe dado algum diagnóstico para a sua situação? Não <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Qual? _____ Sofre de alguma doença auto-imune, nomeadamente a nível de Tiróide Não <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Supra renal Não <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Diabetes tipo I Não <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Miastenia Não <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Outra _____ Níveis hormonais aquando da menopausa: FSH _____ Estradiol _____ Estudo de cariótipo Não <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Resultado _____ Realizou alguma cirurgia de remoção parcial de tecido ovárico? Não <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Há quanto tempo? _____ Dados de ecografias ováricas, incluindo se houve contagem de folículos _____ _____

4. Outras informações Tem alguma familiar ou conhecida que sofra do mesmo problema de menopausa precoce? Não <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Nome _____ Idade _____ Grau de parentesco _____ Área de residência _____ Tem algum familiar com atrasos de desenvolvimento, dificuldades de aprendizagem, atraso mental ou autismo? Não <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Nome _____ Idade _____ Grau de parentesco _____ Área de residência _____ Tem algum familiar com ataxia, tremores ou Parkinson? Não <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Nome _____ Idade _____ Grau de parentesco _____ Área de residência _____

1.O objectivo é determinar se a paciente possui um filho com atraso mental, que possa ser associado ao SXF.

Anexo B

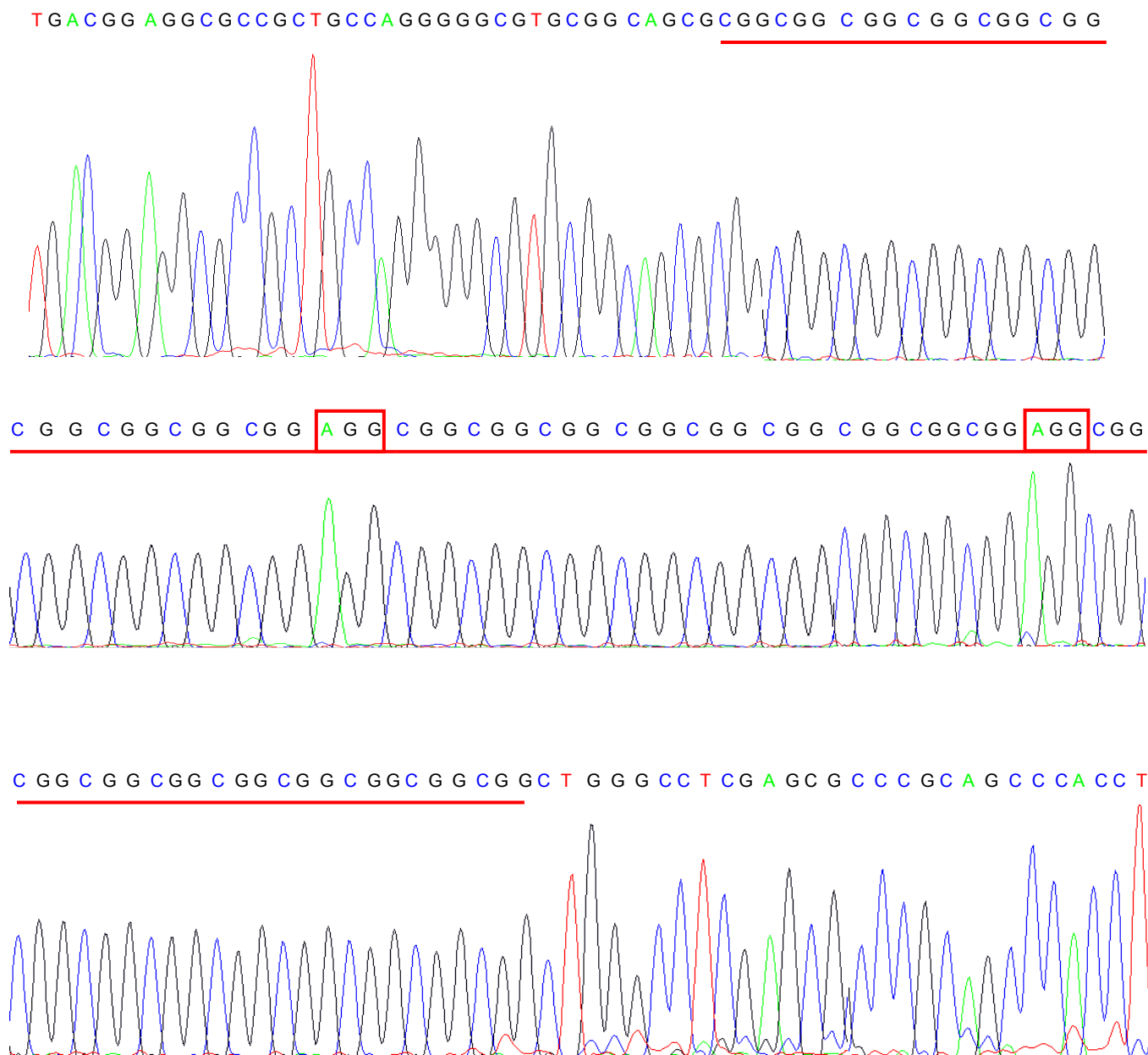


Figura A1. Electroferograma de sequenciação de uma amostra de um paciente do sexo masculino. O traço a vermelho assinala a região repetitiva contendo os trinucleótidos CGG. O paciente possui 30 repetições CGG, um padrão de interrupção 10+1+9+1+9 e a primeira interrupção AGG localizada na 11^a posição.

Anexo C

Sonda	♂ N1 N2		♂ M3 M4		♀ N5 N6		♀ M7 M8		♀ com resultado de PCR inconclusivo				
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
FMR1 Probe 03727-L03187	0,01	0,01	0,01	0,00	0,15	0,12	0,26	0,12	0,12	0,10	0,15	0,08	0,00
FMR1 Probe 03725-L13188	0,01	0,00	0,97	1,00	0,45	0,47	0,47	0,60	0,46	0,35	0,37	0,37	0,01
FMR1 Probe 03722-L03182	0,00	0,01	0,86	0,93	0,28	0,31	0,54	0,50	0,28	0,30	0,30	0,30	0,02
FMR1 Probe 12916-L14361	0,01	0,02	1,49	1,00	0,45	0,49	1,12	0,81	0,61	0,60	0,72	0,57	0,01
FMR1 Probe 12915-L14360	0,00	0,01	0,93	0,88	0,23	0,28	0,60	0,46	0,29	0,28	0,29	0,31	0,01
FMR1 Probe 04037-L03722	0,02	0,02	0,71	0,65	0,19	0,26	0,25	0,37	0,26	0,23	0,29	0,16	0,02
FMR1 Probe 12918-L12030	0,04	0,03	0,93	1,01	0,46	0,31	0,58	0,47	0,33	0,30	0,25	0,31	0,02
FMR1 Probe 03728-L14363	1,01	0,93	1,22	1,02	1,03	1,00	1,20	1,01	1,10	1,02	0,91	1,01	0,93
FMR1 Probe 05311-L03189	0,90	0,99	0,92	0,98	0,97	0,88	1,00	1,02	0,94	0,87	0,86	0,86	0,98
FMR1 Probe 03730-L14537	0,91	1,01	0,95	1,00	0,93	0,99	1,10	1,10	0,90	0,99	1,07	1,12	1,47
FMR1 Probe 12913-L14366	0,89	1,05	0,92	0,95	0,93	0,95	1,25	1,16	1,00	0,99	0,97	1,15	1,66
FMR1 Probe 03731-L03191	0,94	1,18	0,89	0,97	0,97	1,10	1,28	1,22	1,03	1,08	1,14	1,14	1,54
FMR1 Probe 13214-L14539	0,92	0,98	0,87	0,92	0,95	0,95	1,13	1,10	0,92	0,87	0,96	0,92	1,39
FMR1 Probe 04031-L00833	0,97	0,95	1,01	0,99	0,98	1,03	0,93	1,00	0,98	0,89	1,05	0,94	1,08
AFF2 Probe 04036-L03198	0,17	0,08	0,11	0,12	0,60	0,60	0,46	0,53	0,59	0,49	0,48	0,55	0,04
AFF2 Probe 03733-L14365	0,01	0,02	0,02	0,02	0,47	0,41	0,26	0,42	0,35	0,32	0,37	0,35	0,02
AFF2 Probe 03734-L03194	0,00	0,02	0,01	0,00	0,34	0,29	0,13	0,19	0,22	0,17	0,25	0,21	0,00
AFF2 Probe 03736-L03196	0,01	0,02	0,02	0,01	0,55	0,46	0,45	0,55	0,45	0,48	0,60	0,52	0,01
AFF2 Probe 12917-L03197	1,03	0,01	74,16	0,72	19,67	0,01	0,04	22,91	0,01	0,67	0,15	63,51	0,77
AFF2 Probe 00493-L00369	1,01	0,83	1,04	1,02	1,01	1,03	0,97	1,04	0,96	1,02	1,11	1,03	0,98
AFF2 Probe 03739-L03199	1,03	1,06	1,04	1,00	1,08	1,15	1,19	1,14	0,99	1,05	1,04	1,08	1,10
AFF2 Probe 03516-L02322	1,00	0,87	1,18	0,98	1,01	0,99	0,93	0,99	0,93	1,00	1,04	1,07	0,99
AFF2 Probe 12914-L03200	0,90	0,96	0,98	0,96	0,96	1,00	1,05	1,05	0,95	0,90	0,89	0,94	1,18
AFF2 Probe 03741-L03201	1,04	0,96	0,98	0,99	1,00	1,34	1,11	1,20	0,99	1,06	0,98	1,04	1,23
AFF2 Probe 03742-L14538	0,97	1,17	0,96	0,97	1,04	1,09	1,66	1,26	1,05	1,13	1,08	1,12	1,62
AFF2 Probe 03743-L03203	0,95	1,35	1,03	1,03	1,10	1,12	1,71	1,41	1,21	1,31	1,26	1,30	1,85
AFF2 Probe 04029-L14362	1,10	1,12	1,34	1,02	1,19	1,07	1,02	1,12	1,24	1,32	1,24	1,29	1,20
IDS Probe 05244-L04624	0,93	0,92	1,00	0,99	0,98	0,93	1,03	0,96	0,92	0,86	0,84	0,90	1,12
FLNA Probe 04138-L03495	0,98	1,22	0,82	0,94	1,02	1,13	1,45	1,35	0,95	0,90	1,02	1,06	2,19
MITF Probe 10794-L11434	1,02	1,00	1,01	0,98	1,04	1,02	1,06	1,12	0,97	1,05	0,99	1,13	1,34
Digestion control Probe 04046-L02172	0,03	0,04	0,03	0,03	0,00	0,05	0,05	0,04	0,06	0,01	0,04	0,04	0,08
Digestion control Probe 08843-L08965	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01	0,02	0,01	0,01	0,01	0,00	0,00	0,01	0,01
Reference Probe 03047-L14364	1,01	1,00	1,13	1,05	1,06	0,98	1,20	1,05	1,03	1,02	1,02	1,10	1,01
Reference Probe 02923-L02317	0,94	1,35	0,93	0,99	1,00	1,08	1,41	1,33	1,23	1,21	1,29	1,37	1,99
Reference Probe 06467-L06571	1,03	0,91	1,13	1,00	1,05	1,00	0,81	0,93	1,00	0,95	0,92	0,99	0,84
Reference Probe 03644-L03057	0,01	0,01	0,02	0,03	0,32	0,21	0,22	0,33	0,21	0,20	0,29	0,19	0,26
Reference Probe 02566-L10170	0,92	0,93	0,92	0,94	0,90	0,86	0,83	0,91	0,78	0,76	0,71	0,87	1,00
Reference Probe 05186-L04567	0,94	0,98	1,00	1,00	0,99	0,84	0,96	0,96	0,96	0,94	0,94	0,93	1,00
Reference Probe 05195-L04576	0,89	1,06	0,86	0,97	0,93	0,98	1,17	1,12	0,99	1,00	1,04	0,99	1,49
Reference Probe 01690-L00423	1,07	0,86	1,22	0,99	1,05	1,08	0,85	0,98	0,96	0,94	1,04	1,00	0,79
Reference Probe 02912-L02306	1,00	1,00	0,94	1,01	0,96	1,04	1,13	1,16	0,96	1,04	0,97	1,02	1,43
Reference Probe 02915-L02309	0,94	1,40	0,78	1,00	0,94	1,08	1,50	1,45	1,05	1,06	1,07	1,17	2,31
Reference Probe 05875-L05275	1,02	1,02	1,11	0,99	1,00	1,08	1,00	1,01	1,12	1,20	1,20	1,15	1,07
Reference Probe 06794-L06386	1,04	1,08	1,12	1,08	1,06	1,09	1,05	1,00	1,22	1,20	1,00	1,23	0,97
Reference Probe 12647-L11339	1,04	0,91	1,20	1,00	1,06	0,96	0,91	0,94	1,10	1,00	0,85	0,96	0,78

Tabela A1. Resultado de Coffalyser obtido na análise de metilação de 13 amostras. A primeira coluna discrimina todas as sondas que compõem o kit, estando assinaladas a vermelho as sondas de *FMR1* com local de restrição. Cada coluna de valores corresponde ao resultado da análise de metilação para uma amostra. Os valores de cada célula indicam o grau de metilação, sendo que quanto mais elevado maior a percentagem de metilação.

Anexo D

Gene	Posição	Amostras								
		1	4	5	6	7	8	9	10	13
FMR1 Probe 03727-L03187	Xq27.3	N (1,17)	G (1,42)	N (0,94)	G (1,31)	N (0,85)	N (1,1)	N (1,1)	N (1,05)	A (0,63)
FMR1 Probe 03725-L13188	Xq27.3	N (1,21)	G (1,61)	N (1,11)	N (0,99)	N (1,15)	N (1,23)	N (0,98)	N (0,95)	A (0,64)
FMR1 Probe 03722-L03182	Xq27.3	N (1,14)	N (0,88)	N (1,09)	N (1,01)	N (0,94)	N (1,13)	N (1)	N (0,97)	A (0,67)
FMR1 Probe 12916-L14361	Xq27.3	N (1,02)	N (0,93)	N (0,94)	N (1,01)	N (0,72)	N (0,96)	N (1,03)	N (1,04)	LOH (0,56)
FMR1 Probe 12915-L14360	Xq27.3	N (0,98)	N (1,13)	N (0,99)	N (1,02)	N (0,89)	N (1,01)	N (1,03)	N (0,98)	A (0,61)
FMR1 Probe 04037-L03722	Xq27.3	N (0,99)	N (1,05)	N (0,96)	N (1,03)	N (0,91)	N (1,02)	N (1,03)	N (0,95)	LOH (0,57)
FMR1 Probe 12918-L12030	Xq27.3	N (1,02)	N (1,12)	N (0,96)	N (0,94)	N (0,89)	N (1,03)	N (0,97)	N (1)	LOH (0,58)
FMR1 Probe 03728-L14363	Xq27.3	N (1,01)	N (1,13)	N (0,99)	N (0,99)	N (0,95)	N (1,09)	N (0,99)	N (1)	LOH (0,59)
FMR1 Probe 05311-L03189	Xq27.3	N (1,01)	N (1,09)	N (0,92)	N (1,08)	N (1,19)	N (0,98)	N (1,04)	N (1,06)	LOH (0,55)
FMR1 Probe 03730-L14537	Xq27.3	G (1,3)	N (1,2)	N (1,06)	N (1,03)	N (1,17)	N (1,24)	N (1)	N (0,97)	LOH (0,55)
FMR1 Probe 12913-L14366	Xq27.3	N (0,99)	G (1,32)	N (0,98)	N (1)	N (0,95)	N (1,01)	N (1,01)	N (1)	LOH (0,54)
FMR1 Probe 03731-L03191	Xq27.3	N (1,08)	N (0,97)	N (1,04)	N (1)	N (1,03)	N (1,1)	N (1)	N (0,96)	LOH (0,58)
FMR1 Probe 13214-L14539	Xq27.3	N (1,03)	A (0,69)	N (0,95)	N (0,99)	N (1,16)	N (1)	N (1)	N (1,02)	LOH (0,51)
FMR1 Probe 04031-L00833	Xq27.3	N (0,92)	N (0,76)	N (0,98)	N (1,04)	N (0,88)	N (0,93)	N (1,03)	N (1,07)	LOH (0,56)
AFF2 Probe 04036-L03198	Xq28	N (1,19)	N (0,91)	N (1,12)	N (1,11)	N (0,89)	N (1,2)	N (0,93)	N (1,12)	A (0,68)
AFF2 Probe 03733-L14365	Xq28	N (1,02)	A (0,6)	N (0,96)	N (1,03)	N (0,88)	N (0,97)	N (1,04)	N (1)	LOH (0,56)
AFF2 Probe 03734-L03194	Xq28	N (1,07)	N (0,95)	N (1,15)	N (0,94)	N (0,96)	N (1,14)	N (0,98)	N (1)	A (0,64)
AFF2 Probe 03736-L03196	Xq28	G (1,49)	G (1,41)	N (1,28)	N (1,13)	G (1,5)	G (1,63)	N (0,97)	N (1)	A (0,64)
AFF2 Probe 12917-L03197	Xq28	N (0,81)	N (1,02)	N (0,77)	N (0,99)	N (1,11)	N (0,83)	N (1)	N (1,02)	LOH (0,5)
AFF2 Probe 00493-L00369	Xq28	G (2,34)	G (1,98)	G (1,52)	N (1,22)	G (2,11)	G (2,49)	N (0,94)	N (1)	N (0,86)
AFF2 Probe 03739-L03199	Xq28	N (1,07)	N (1,12)	N (0,97)	N (0,99)	N (1)	N (1,02)	N (1,07)	N (1,04)	LOH (0,6)
AFF2 Probe 03516-L02322	Xq28	N (1,1)	N (0,8)	N (0,99)	N (1,04)	N (0,98)	N (1,06)	N (1,02)	N (1)	LOH (0,54)
AFF2 Probe 12914-L03200	Xq28	N (1,01)	N (1,08)	N (1,03)	N (1,04)	N (0,92)	N (1)	N (1)	N (1,03)	LOH (0,54)
AFF2 Probe 03741-L03201	Xq28	N (0,96)	N (0,92)	N (1,09)	N (0,9)	N (0,92)	N (1)	N (1,08)	N (1)	LOH (0,58)
AFF2 Probe 03742-L14538	Xq28	N (1,16)	G (1,34)	N (1,02)	N (0,99)	N (1,03)	N (1,17)	N (0,95)	N (0,91)	LOH (0,56)
AFF2 Probe 03743-L03203	Xq28	N (0,96)	N (1,02)	N (0,95)	N (1,05)	N (0,92)	N (0,97)	N (1,06)	N (1)	LOH (0,57)
AFF2 Probe 04029-L14362	Xq28	N (1,01)	N (1,12)	N (0,97)	N (1,01)	N (0,93)	N (0,96)	N (1,05)	N (1)	LOH (0,57)
IDS Probe 05244-L04624	Xq28	N (1,04)	N (1,17)	N (0,98)	N (0,99)	N (1,13)	N (1,08)	N (0,98)	N (1)	LOH (0,57)
FLNA Probe 04138-L03495	Xq28	N (1,21)	G (1,3)	N (0,98)	N (0,99)	N (1,03)	N (1,21)	N (0,94)	N (1,01)	LOH (0,53)
MITF Probe 10794-L11434	03p14.1	G (1,68)	G (1,46)	N (0,96)	N (0,98)	N (1,2)	N (1)	N (1,12)	N (1,1)	N (1)
Digestion control Probe 04046-L02172	03p24.2	G (1,71)	G (1,85)	N (1,04)	N (1,01)	N (0,91)	N (0,93)	N (1,04)	N (0,97)	N (1)
Digestion control Probe 08843-L08965	17q21.33	G (1,69)	G (1,39)	N (0,92)	N (0,99)	N (0,95)	N (0,84)	N (1,03)	N (0,99)	N (0,96)
Reference Probe 03047-L14364	Xp21.2	N (1)	N (0,87)	N (0,99)	N (1,04)	N (1,04)	N (1)	N (1,01)	N (1)	N (1,04)
Reference Probe 02923-L02317	Xp21.3	N (1,03)	N (1,06)	N (1)	N (1,01)	N (0,96)	N (1)	N (0,96)	N (1)	N (1,03)
Reference Probe 06467-L06571	Xp22.13	N (1,03)	N (0,92)	N (1,05)	N (0,98)	N (1)	N (1,05)	N (0,94)	N (0,95)	N (1,12)
Reference Probe 03644-L03057	Xp22.2	G (1,37)	N (1)	N (1,04)	N (0,85)	N (1,17)	G (1,4)	N (0,77)	N (0,79)	N (1,07)
Reference Probe 02566-L10170	Xp22.2	N (1)	N (0,91)	N (0,96)	N (1,07)	N (0,9)	N (1)	N (1,09)	N (1,05)	N (1)
Reference Probe 05186-L04567	Xp22.31	N (0,99)	N (1,03)	N (0,93)	N (1,07)	N (1,09)	N (1,01)	N (1,01)	N (0,98)	N (1)
Reference Probe 05195-L04576	Xp22.31	N (1)	N (0,91)	N (0,98)	N (0,99)	N (1,05)	N (0,97)	N (1)	N (1,01)	N (1,03)
Reference Probe 01690-L00423	Xq12	N (0,99)	N (0,9)	N (1,01)	N (0,99)	N (0,88)	N (1)	N (1,05)	N (1)	N (1,11)
Reference Probe 02912-L02306	Xq12	N (0,98)	N (1,05)	N (0,96)	N (1,02)	N (0,89)	N (0,97)	N (1,04)	N (0,96)	N (1)
Reference Probe 02915-L02309	Xq12	N (1,09)	N (1,09)	N (1,07)	N (1,01)	N (1)	N (1,01)	N (0,99)	N (0,99)	N (1)
Reference Probe 05875-L05275	Xq22.3	G (1,35)	N (1,18)	N (1,06)	N (0,72)	G (1,48)	G (1,54)	A (0,68)	A (0,66)	N (1)
Reference Probe 06794-L06386	Xq27.1	N (1,01)	N (1,06)	N (1,03)	N (0,98)	N (0,97)	N (1,04)	N (1)	N (1)	LOH (0,58)
Reference Probe 12647-L11339	Xq28	N (0,92)	N (1)	N (0,96)	N (1)	N (1,01)	N (0,98)	N (1)	N (1,01)	LOH (0,57)

Tabela A2. Resultado de Coffalyser obtido na análise do número de cópias de 9 amostras.

Continuação da legenda da tabela A2 do anexo D.

Os valores de cada célula são obtidos através do quociente entre a área relativa de cada sonda de amostras referência e amostras a analisar. Por definição, quocientes entre 0.7 e 1.3 correspondem a amostras normais, indicadas na tabela por N e de cor azul. Quocientes inferiores a 0.7 indicam a ocorrência de deleção, que no caso de mulheres se traduz numa situação de perda de heterozigotia (LOH), assinalada a cor laranja. Quando o quociente é superior a 1.3 indica ganho de material genómico (G), assinalado a cor verde. A análise dos resultados deve ser feita de forma crítica pois como é feita uma comparação entre as várias amostras, por vezes surgem resultados que não correspondem à realidade. Por exemplo, no caso 13, 7 sondas apresentam um resultado Ambíguo (A). No entanto, não parece coerente que determinadas sondas localizadas na mesma região e intercaladas entre outras que apresentam perda de heterozigotia tenham este resultado. A conclusão óbvia é que se trata de uma perda de material que envolve uma região contínua.

Nas restantes amostras existem várias células que denotam ganho de material genómico. Na maioria das vezes, a mesma sonda indica ganho de material genómico em várias amostras. Tal resultado não deve ser considerado real, pois parece pouco provável que grande número de pacientes apresente ganhos na mesma região, e também que tais ganhos correspondam a regiões de pequena dimensão. Estes resultados poderão ser devidos à própria análise em que é feita uma comparação entre várias amostras.

Anexo E

Caso	Análise de Fragmentos	Sequenciação	MS- MLPA	Conclusão
♂ 1	Ausência de amplificação	Ausência de amplificação	% de metilação elevada	Homem com X-Frágil
♂ 2	Ausência de amplificação	Ausência de amplificação	% de metilação elevada	Homem com X-Frágil
♂ 3	Ausência de amplificação	Ausência de amplificação	% de metilação elevada	Homem com X-Frágil
♀ 1	Homozigotia ou mutação?	Homozigotia ou mutação?	% de metilação elevada	Mulher com X-Frágil
♀ 2	Homozigotia ou mutação?	Homozigotia ou mutação?	% de metilação elevada	Mulher com X-Frágil
♀ 3	Homozigotia ou mutação?	Homozigotia ou mutação?	Sem resultado	Homozigotia ou mutação?
♀ 4	Homozigotia ou mutação?	Homozigotia ou mutação?	Sem resultado	Homozigotia ou mutação?
♀ 5	Homozigotia ou mutação?	2 sequências distintas	Sem resultado	Mulher normal
♀ 6	Homozigotia ou mutação?	2 sequências distintas	Sem resultado	Mulher normal
♀ 7	Homozigotia ou mutação?	2 sequências distintas	Sem resultado	Mulher normal
♀ 8	Homozigotia ou mutação?	2 sequências distintas	Sem resultado	Mulher normal
♀ 9	Homozigotia ou mutação?	Homozigotia ou mutação?	% de metilação reduzida	Mulher normal
♀ 10	Homozigotia ou mutação?	2 sequências distintas	% de metilação reduzida	Mulher normal
♀ 11	Homozigotia ou mutação?	2 sequências distintas	% de metilação reduzida	Mulher normal
♀ 12	Homozigotia ou mutação?	Homozigotia ou mutação?	% de metilação reduzida	Mulher normal

Tabela A3. Resultados obtidos nas várias técnicas e conclusão final relativamente às 15 amostras com resultado inicialmente inconclusivo.

♂ 1 e ♂ 2 correspondem aos casos M3 e M4 da Tabela A1 do anexo C.

♀ 1 e ♀ 2 correspondem aos casos M7 e M8 da Tabela A1 do anexo C.

♀ 9 a ♀ 12 correspondem aos casos com a mesma designação da Tabela A1 do anexo C.

Os restantes casos não têm correspondência com nenhuma outra amostra.